



FRO4102257  
REC'D 26 NOV 2004  
WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 08 SEP. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

#### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

### REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

#### page 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 e II / 21052

<p>REMISE DES RECETTES DATE 4 SEPT 2003 LIEU 75 INPI PARIS</p> <p>N° D'ENREGISTREMENT 0310470</p> <p>NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI</p> <p>DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI - 4 SEP. 2003</p> <p>Vos références pour ce dossier (facultatif) MJPbv644/112</p>		<p>Réserve à l'INPI</p> <p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>CABINET ORES 36, rue de St-Pétersbourg 75008 PARIS</p>
<p>2 NATURE DE LA DEMANDE</p> <p>Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/></p> <p>Demande divisionnaire <input type="checkbox"/></p> <p>Demande de brevet initiale ou demande de certificat d'utilité initiale <input type="checkbox"/></p> <p>Transformation d'une demande de brevet européen Demande de brevet initiale <input type="checkbox"/></p>		<p><input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télecopie</p> <p>Cochez l'une des 4 cases suivantes</p>
<p>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</p> <p>UTILISATION DE LA PROTEINE Pks 13 CODANT POUR LA CODENSASE DES ACIDES MYCOLIQUES DES MYCOBACTERIES ET GENRES APPARENTES COMME CIBLE D'ANTIBIOTIQUES.</p>		
<p>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</p>		<p>Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="text"/></p> <p>Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="text"/></p> <p>Pays ou organisation Date <input type="text"/> N° <input type="text"/></p> <p><input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</p>
<p>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</p> <p>Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF</p>		<p><input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique</p> <p>CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE</p>
<p>Domicile ou siège</p>	Rue	3, rue Michel Ange
	Code postal et ville	75016 PARIS
	Pays	
<p>Nationalité</p> <p>N° de téléphone (facultatif)</p> <p>Adresse électronique (facultatif)</p>		
<p><input checked="" type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</p>		

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
page 2/2

**BR2**

REMISE DES PIÈCES	Réserve à l'INPI
DATE	4 SEPT 2003
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0310470
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>																							
<table border="1"> <tr> <td>Nom</td> <td>VIALLE-PRESLES</td> </tr> <tr> <td>Prénom</td> <td>Marie José</td> </tr> <tr> <td>Cabinet ou Société</td> <td>CABINET ORES</td> </tr> <tr> <td>N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td> <table border="1"> <tr> <td>Rue</td> <td>36, rue de St-Pétersbourg</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>75100 PARIS</td> </tr> <tr> <td>Pays</td> <td>FRANCE</td> </tr> </table> </td> </tr> <tr> <td>N° de téléphone (facultatif)</td> <td>01.53.21.11.00</td> </tr> <tr> <td>N° de télécopie (facultatif)</td> <td>01.53.21.08.88</td> </tr> <tr> <td>Adresse électronique (facultatif)</td> <td>ores@cabinet-ores.com</td> </tr> </table>		Nom	VIALLE-PRESLES	Prénom	Marie José	Cabinet ou Société	CABINET ORES	N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		Adresse	<table border="1"> <tr> <td>Rue</td> <td>36, rue de St-Pétersbourg</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>75100 PARIS</td> </tr> <tr> <td>Pays</td> <td>FRANCE</td> </tr> </table>	Rue	36, rue de St-Pétersbourg	Code postal et ville	75100 PARIS	Pays	FRANCE	N° de téléphone (facultatif)	01.53.21.11.00	N° de télécopie (facultatif)	01.53.21.08.88	Adresse électronique (facultatif)	ores@cabinet-ores.com
Nom	VIALLE-PRESLES																						
Prénom	Marie José																						
Cabinet ou Société	CABINET ORES																						
N °de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel																							
Adresse	<table border="1"> <tr> <td>Rue</td> <td>36, rue de St-Pétersbourg</td> </tr> <tr> <td>Code postal et ville</td> <td>75100 PARIS</td> </tr> <tr> <td>Pays</td> <td>FRANCE</td> </tr> </table>	Rue	36, rue de St-Pétersbourg	Code postal et ville	75100 PARIS	Pays	FRANCE																
Rue	36, rue de St-Pétersbourg																						
Code postal et ville	75100 PARIS																						
Pays	FRANCE																						
N° de téléphone (facultatif)	01.53.21.11.00																						
N° de télécopie (facultatif)	01.53.21.08.88																						
Adresse électronique (facultatif)	ores@cabinet-ores.com																						
<b>7 INVENTEUR (S)</b> <p>Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques</p>																							
<p>Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes</p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/> Oui</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/> Oui	<input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)																				
<input type="checkbox"/> Oui																							
<input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)																							
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> <p>Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)</p> <table> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
<input checked="" type="checkbox"/>																							
<input type="checkbox"/>																							
<p>Établissement immédiat ou établissement différé</p> <p>Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)</p> <p>Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt</p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/> Oui</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Non</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/> Oui	<input type="checkbox"/> Non																				
<input type="checkbox"/> Oui																							
<input type="checkbox"/> Non																							
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b> <p>Uniquement pour les personnes physiques</p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)	<input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG																				
<input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)																							
<input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG																							
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b> <p>Cochez la case si la description contient une liste de séquences</p> <table> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>																				
<input checked="" type="checkbox"/>																							
<input type="checkbox"/>																							
<p>Le support électronique de données est joint</p> <p>La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe</p>																							

Je vous avise que l'invention décrite  
est entièrement conforme à la loi.

INPI

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

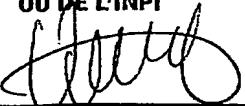
**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**

Page suite N° 1.../1...



REPRISE DES PIÈCES	Réserve à l'INPI
DATE	4 SEPT 2003
LIEU	75 INPI PARIS
N° D'ENREGISTREMENT	0310470
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI	

Cet Imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire DB 829 @ W / 010702

<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		MJPbv644/112
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		UNIVERSITE PARIS SUD XI
Prénoms		
Forme juridique		Etablissement public
N° SIREN		111111111111
Code APE-NAF		11111
Domicile ou siège	Rue	15 rue Georges Clémenceau
	Code postal et ville	9114015 ORSAY Cedex
	Pays	
Nationalité		
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input type="checkbox"/> Personne morale <input checked="" type="checkbox"/> Personne physique
Nom ou dénomination sociale		
Prénoms		
Forme juridique		
N° SIREN		111111111111
Code APE-NAF		11111
Domicile ou siège	Rue	
	Code postal et ville	11111
	Pays	
Nationalité		
N° de téléphone (facultatif)		
N° de télécopie (facultatif)		
Adresse électronique (facultatif)		
<b>6 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		 VIALLE-PRESLES Marie José (n° 93-2009)
		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 

La présente invention est relative à une nouvelle enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques, et à son utilisation pour le criblage d'antibiotiques, notamment d'anti-mycobactériens.

5 Les acides mycoliques sont des acides gras à longue chaîne,  $\alpha$ -alkylés et  $\beta$ -hydroxylés, présents sous forme d'esters dans les parois cellulaires de bactéries d'une lignée phylogénétique particulière des actinomycètes, le sous-ordre des *Corynebacterineae*, également dénommés 10 «mycolatas», comprenant les genres bactériens : *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordona* et *Tsukamurella*.

15 Parmi les mycolatas, on trouve des pathogènes majeurs, notamment les mycobactéries *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose, et *Mycobacterium leprae*, agent de la lèpre.

20 Depuis une quinzaine d'années, on observe une recrudescence de la tuberculose, notamment dans les pays industrialisés. Ce phénomène est en partie lié à l'apparition de souches du bacille tuberculeux résistantes aux antibiotiques existants. Ainsi, la conception de nouveaux médicaments antituberculeux est redevenue une priorité importante.

25 Parmi les médicaments anti-tuberculeux les plus efficaces, se trouvent ceux qui interfèrent avec la biosynthèse de l'enveloppe des mycobactéries, tels que l'isoniazide, l'éthionamide et l'ethambutol (WEBB et al., Molecular Biology and Virulence 1 : 287-307 (eds. Ratledge, C. & Dale, J.) (Blackwell Science Ltd, Oxford), 1999). Les 30 acides mycoliques représentent un constituant majeur de cette enveloppe. Il a été rapporté qu'ils intervenaient dans des fonctions biologiques importantes, participant notamment à la

Ann. Rev. Biochem. 64 : 29-63, 1995 ; DAFE et DRAPER, Adv. Microb. Physiol. 39 : 131-203, 1998).

Les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des acides mycoliques varient en longueur et en structure (Figure 1A), mais présentent un motif commun (motif mycolique :  $-\text{CHOH-CHR}_2\text{-COOH}$ ), ce qui suggère qu'une étape enzymatique impliquée dans la formation de ce motif est commune à toutes les mycolatas.

Selon un modèle généralement accepté actuellement (GASTAMBIDE-ODIER et al., Biochemische Zeitschrift 333 : 285-295, 1960), les dernières étapes de la biosynthèse des acides mycoliques consisteraient en une cascade de réactions (Figure 1B) : (1) activation de l'acyl pour former une molécule d'acyl-CoA catalysée par une acyl-CoA synthase ; (2) carboxylation d'une molécule d'acyl-CoA pour former une molécule d'acylmalonyl-CoA catalysée par une acyl-CoA carboxylase ; (3) condensation de type Claisen d'une molécule d'acyl-CoA et d'une molécule d'acylmalonyl-CoA pour former l'intermédiaire  $\beta$ -ceto acyl, catalysée par une condensase ; (4) réduction de l'intermédiaire  $\beta$ -ceto acyl pour former l'acide mycolique catalysée par une réductase.

Le motif mycolique serait probablement formé lors de la réaction de condensation de type Claisen. Toutefois, jusqu'à présent l'enzyme responsable de cette condensation n'avait pas été identifiée.

Cette réaction de condensation apparaît similaire à la condensation d'acyl-CoA avec le methylmalonyl-CoA qui intervient dans la formation d'acides gras ramifiés polyméthylés chez les mycobactéries (MATHUR et al., J. Biol. Chem. 267 : 19388-19395, 1996 ; SIRAKOVA et al., J. Biol. Chem. 276 : 16833-16839, 2001 ; DUBEY et al., Mol. Microbiol. 45: 1451-1459, 2000), où elle est catalysée par des polykétides synthases (Pks) de type I.

Les Inventeurs ont émis l'hypothèse que la réaction de condensation conduisant aux acides mycoliques chez les mycolatas pourrait être catalysée par une Pks de type I ayant une spécificité de substrat inhabituelle.

Pour vérifier cette hypothèse, ils ont d'abord recherché, à partir de séquences de mycolatas présentes dans

les bases de données, s'il existait une Pks commune à ces bactéries et comprenant les domaines fonctionnels nécessaires à la réaction de condensation, à savoir : un domaine acyl transférase (AT), un domaine kétosynthase (KS), un domaine « acyl carrier protein » (ACP), et un domaine thioestérase (TE).

Ils ont ainsi identifié chez *M. tuberculosis*, un gène dénommé *pks13* codant pour une Pks de type I, ainsi que des orthologues de ce gène chez les autres mycobactéries, ainsi que chez les corynébactéries. Ces protéines possèdent de fortes similarités de séquence (70 à 80% d'identité sur toute la longueur de la protéine pour les différentes Pks13 mycobactériennes et 40 à 50% d'identité entre Pks13 de *M. tuberculosis* et Pks13 de *C. glutamicum* ou *C. diphtheriae*), et possèdent en outre les domaines, mentionnés ci-dessus, qui sont nécessaires à la réaction de condensation et au relargage du produit.

Ces protéines seront donc désignées ci-après sous le terme général « Pks13 »

Les Inventeurs ont en outre montré que l'inactivation du gène codant pour Pks13 conduisait au blocage de la synthèse des acides mycoliques, et à une perte de la viabilité bactérienne.

En outre, ils ont produit et purifié la protéine Pks13 sous forme recombinante.

Les résultats obtenus par les Inventeurs montrent que Pks13 est la condensase intervenant dans la synthèse des acides mycoliques, et qu'il s'agit d'une enzyme clé dans l'assemblage de l'enveloppe des mycolatas, et essentielle pour la viabilité des mycobactéries.

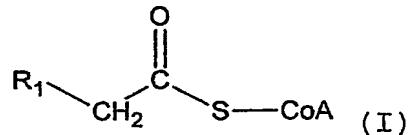
La présente invention a pour objet une protéine purifiée, dénommée Pks13, impliquée dans la biosynthèse des

b) elle possède un domaine acyl transférase (pfam00698), un domaine kétoacyl synthase (pfam02801 ou pfam00109), au moins un domaine acyl carrier protein (COG0331 ou COG0304,), et un domaine thioestérase (COG3319 ou pfam00975)

5 c) elle catalyse une condensation de Claisen entre une molécule d'acyl-CoA et une molécule d'acylmalonyl-CoA.

Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, ladite protéine Pks13 catalyse une condensation de Claisen entre :

10 a) une molécule d'acyl-CoA de formule I :

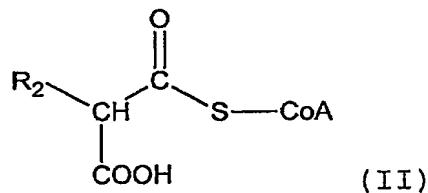


dans laquelle R1 est une chaîne comprenant de 6 à 68 atomes de carbone, pouvant contenir une ou plusieurs doubles liaisons  $-\text{C}=\text{C}-$ , et/ou un ou plusieurs cycles *cis/trans*-

15 cyclopropane, et/ou un ou plusieurs groupes  $\text{CH}_3$   $\text{---} \text{CH} \text{---} \text{O} \text{---} \text{C} \text{---}$  et/ou pouvant porter un ou plusieurs groupes latéraux choisis parmi  $-\text{CH}_3$ ,  $=\text{O}$ ,  $-\text{O---CH}_3$  ;

et

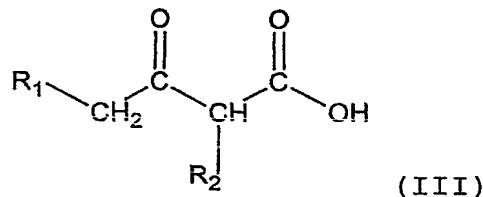
b) une molécule d'acylmalonyl-CoA de formule II :



20

dans laquelle R2 est un alcane linéaire comprenant de 10 à 24 atomes de carbone ;

pour former un intermédiaire  $\beta$ -ceto acyl de formule III :



25 dans laquelle R1 et R2 sont tels que définis ci-dessus.

Des dispositions particulières de ce mode de réalisation sont les suivantes :

5 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un  $\beta$ -ceto acyl de formule III dans laquelle R1 comprend de 6-16 atomes de carbone et R2 comprend de 12 à 16 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Corynebacterium* ;

10 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un  $\beta$ -ceto acyl de formule III dans laquelle R1 comprend de 28-48 atomes de carbone et R2 comprend de 14 à 16 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Gordona* ;

15 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un  $\beta$ -ceto acyl de formule III dans laquelle R1 comprend de 42 à 68 atomes de carbone et R2 comprend de 18 à 24 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Mycobacterium* ;

20 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un  $\beta$ -ceto acyl de formule III dans laquelle R1 comprend de 24 à 46 atomes de carbone et R2 comprend de 10 à 16 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Nocardia* ;

25 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un  $\beta$ -ceto acyl de formule III dans laquelle R1 comprend de 14 à 34 atomes de carbone et R2 comprend de 10 à 16 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Rhodococcus* ;

30 - ladite protéine Pks13 catalyse la formation d'un  $\beta$ -ceto acyl de formule III dans laquelle R1 comprend de 40 à 56 atomes de carbone et R2 comprend de 16 à 10 atomes de carbones. Ladite protéine peut notamment être obtenue à partir du genre *Leptothrix* ;

70% d'identité avec la protéine Pks13 de *M. tuberculosis* (SEQ ID NO: 1).

Selon encore un autre mode de réalisation de la présente invention, ladite protéine Pks13 possède au moins 5 50% d'identité, de préférence au moins 60%, et de manière tout à fait préférée au moins 70% d'identité avec la protéine Pks13 de *Corynebacterium glutamicum* (SEQ ID NO: 2).

La présente invention a également pour objet un vecteur d'expression, comprenant une séquence 10 polynucléotidique codant pour une protéine Pks13 conforme à l'invention, ainsi qu'une cellule-hôte, procaryote ou eucaryote, transformée par ledit vecteur d'expression.

La présente invention a également pour objet un procédé de production d'une protéine Pks13 conforme à 15 l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'une cellule-hôte conforme à l'invention, et la purification de la protéine Pks13 à partir de ladite culture.

La présente invention a également pour objet un procédé pour inhiber la biosynthèse de l'enveloppe des 20 mycolatas caractérisé en ce qu'il comprend l'inhibition de l'expression ou de l'activité de la protéine Pks13 chez lesdites bactéries.

Du fait de son caractère essentiel pour la viabilité, et de sa spécificité d'action, la condensase Pks13 25 constitue une excellente cible potentielle pour la conception de nouveaux médicaments, notamment de nouveaux antituberculeux.

La présente invention a en conséquence pour objet l'utilisation d'une condensase Pks13 conforme à l'invention, 30 pour le criblage d'antibiotiques actifs sur les mycolatas, et notamment sur les mycobactéries.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples illustrant l'identification, la 35 production, et la purification de la condensase Pks13, ainsi que les effets de son inactivation sur la viabilité des mycolatas.

**EXEMPLE 1 : IDENTIFICATION DE LA CONDENSASE PKS13**

5 *M. tuberculosis* contient 16 Pks de type I parmi lesquelles 9 se retrouvent également chez *M. leprae*. Parmi ces 9 enzymes putatives, 7 sont déjà connues pour leur implication dans la biosynthèse d'autres groupes de lipides chez *M. tuberculosis* (AZAD et al., J. Biol. Chem. 272 : 16741-16745, 1997 ; CONSTANT et al., J. Biol. Chem. 277 : 38148-38158, 2002). Parmi les deux protéines candidates restantes, celle dénommée ML1229 présente la même 10 organisation de domaine ainsi que de fortes similarités de séquences avec les Pks de type I de *M. tuberculosis* impliquées dans la biosynthèse des acides gras polyméthyl ramifiés. Le second candidat est dénommé Pks13 dans *M. tuberculosis* et ML0101 dans *M. leprae*.

15 L'analyse de la séquence déduite de Pks13 (Numéro d'accession NP\_338459 ; 1733 acides aminés) de *M. tuberculosis* CDC1551 révèle la présence des différents domaines catalytiques nécessaires et suffisants pour la catalyse de la condensation de type Claisen intervenant dans 20 la formation des acides mycoliques : deux domaines « Acyl carrier protein » (ACP) (acides aminés 39 à 107 et 1237 à 1287), un domaine « kétosynthase » (KS) (acides aminés 119 à 543), un domaine « acyl transférase » (AT) (acides aminés 640 à 1045), et un domaine « thioestérase » (TE) (acides aminés 25 1464 à 1543).

Des orthologues de ML1229 et Pks13 ont été recherchés chez différentes espèces en utilisant le programme BLAST (ALTSCHUL et al., Nucleic Acid Res. 25 : 3389-3402, 1997). Les séquences de différentes condensases putatives 30 Pks13 codées par le gène *pks13*, « acyl-CoA synthase » FadD32 et « sous-unité de l'acyl-CoA carboxylase » AccD4 (codées respectivement par deux gènes *fadD32* et *accD4* flanquant le gène *pks13*) ont été comparées à celles de

Aucun orthologue de ML1229 n'a été identifié chez trois espèces de corynèbactéries (*C. glutamicum*, *C. efficiens* et *C. diphtheriae*) alors que des orthologues de Pks13 (ML0101) ont été retrouvés chez les trois espèces de corynèbactéries susmentionnées et chez trois autres espèces de mycobactéries (*M. smegmatis*, *M. marinum* et *M. avium*). Ces protéines Pks13 contiennent les domaines catalytiques requis pour la condensation conduisant à la synthèse de l'acide mycolique, et les gènes correspondants sont localisés en aval de gènes connus pour leur implication dans le transfert de l'acide mycolique sur l'arabinogalactane (PUECH et al., Mol. Microbiol. 44 : 1109-1122, 2002). Les identités des séquences des protéines Pks13 par rapport à la séquence complète de la Pks13 de *M. tuberculosis* sont présentées dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1

<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. leprae</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. avium</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>C. efficiens</i>	<i>C. diphtheriae</i>
FadD32	93%	75%	93%	83%	40%	42%	42%
<b>Pks13</b>	<b>83%</b>	<b>71%</b>	<b>84%</b>	<b>81%</b>	<b>44%</b>	<b>43%</b>	<b>44%</b>
AccD4	91%	81%	85%	80%	54%	52%	53%

La présence de Pks13 a également été mise en évidence dans d'autres espèces bactériennes produisant des acides mycoliques, en amplifiant par PCR un fragment interne de 1 kb de *pks13* à partir du génome de *Nocardia asteroïdes* ATCC19243, *Rhodococcus rhodochrous* ATCC13808 et *Tsukamurella paurometabolum* CIP100753T, en utilisant les amorces dégénérées suivantes :

*pks13a* : 5'-GCTGGARCTVACVTGGGARGC-3' (SEQ ID NO : 3)

*pks13b* : 5'-GTGSGCGTTGGYDCCRAAVCCGAA-3' (SEQ ID NO : 4)

Les conditions de PCR sont : 2,5 unités de Taq polymérase (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS), 10% de diméthyl sulfoxyde (Me<sub>2</sub>SO), 1 mM de dNTP et 4 µM de chaque amorce dans un volume final de 50 µl, dans les conditions recommandées

par le fournisseur (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS). Le programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 35 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 58°C, 1 min 30 sec à 72°C, puis 1 cycle de 10 min à 72°C. Pour *T. paurometabolum*, les étapes 5 à 58°C sont remplacées par des étapes à 50°C.

Les séquences de ces fragments présentent 40% d'identité sur toute leur longueur avec la Pks13 de *M. tuberculosis*, suggérant également la présence de *pks13* chez ces bactéries.

10 L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine Pks13 est retrouvée chez toutes les mycolatas produisant des acides mycoliques, et que parmi les Pks de type I, elle est la seule enzyme susceptible de catalyser la condensation des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  d'acides gras pour former les 15 acides mycoliques.

**EXEMPLE 2 : CLONAGE, SUREXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES PKS13 DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ET CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM**

**Construction des plasmides**

20 La souche de *C. glutamicum* ATCC13032 (DUSCH et al., Appl. Environ. Microbiol. 65 : 1530-1539, 1999) est mise en culture sur un milieu BHI (DIFCO). La souche de *M. tuberculosis* H37Rv est mise en culture sur un milieu liquide Middlebrook 7H9 (DIFCO) additionné de 10% ADC (DIFCO) et de 25 0,05% Tween 80.

Les milieux de culture sont additionnés de kanamycine, d'hygromycine, de chloramphénicol et de sucre quand nécessaire à une concentration finale de 40  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml, 15  $\mu$ g/ml et 10% (p/v), respectivement.

30 L'ADN bactérien total est extrait à partir de 5 ml de cultures liquides saturées comme décrit dans BELICE

13Rtb 5'-GAGGACATATGGCTGACGTAGCGGAATC-3' (SEQ ID NO : 5) et  
 13Stb 5'-CGGTGAAAGCTTCTGCTTGCCTACCTCAC TTG-3' (SEQ ID NO : 6),  
 avec 2,5 unités d'ADN polymérase Pfu (PROMEGA, Lyon, France),  
 10% de diméthyl sulfoxyde (Me<sub>2</sub>SO), et 1 µM de chaque amorce  
 5 dans un volume final de 50 µl, dans les conditions  
 recommandées par le fournisseur (PROMEGA, Lyon, France). Le  
 programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 30 cycles  
 de 1 min à 94°C, 1 min à 57°C, 5 min à 72°C, puis 10 min à  
 10 72°C. Le produit d'amplification est purifié en utilisant le  
 kit Qiaquick (QIAGEN, Courtaboeuf, France), puis digéré avec  
 les enzymes de restriction *NdeI/HindIII*. Le fragment obtenu  
 est inséré dans le vecteur pET26b (NOVAGEN), lui-même coupé  
 avec les enzymes de restriction *NdeI/HindIII*. Le plasmide  
 résultant, dénommé pWM35, contient le gène *pks13* fusionné en  
 15 3' du gène à une étiquette formée de 18 nucléotides codant  
 pour une séquence de 6 histidines.

Le gène *pks13* de *M. tuberculosis* est amplifié par  
 PCR à partir de l'ADN total de la souche H37Rv et des amorces  
 13Rtb 5'-GAGGACATATGGCTGACGTAGCGGAATC-3' (SEQ ID NO : 5) et  
 20 13Ttb 5'-GCTCGGGGATCCTCACTGCTTGCCTACCTCAC-3' (SEQ ID NO : 7),  
 dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. Le  
 produit d'amplification est purifié comme décrit ci-dessus  
 puis digéré avec les enzymes de restriction *NdeI/BamHI*. Le  
 fragment obtenu est inséré dans le vecteur pET15b (NOVAGEN)  
 25 préalablement coupé avec les enzymes de restriction  
*NdeI/BamHI*. Le plasmide résultant, pWM36, possède le gène  
*pks13* fusionné en 5' du gène à une étiquette de 18  
 nucléotides codant pour une séquence de 6 histidines.

#### Plasmide pWM38

30 Le gène *pks13* de *C. glutamicum* ATCC13032 est  
 amplifié par PCR à partir de l'ADN total de cette souche et  
 des amorces 13Ccg 5'-AATATGACTAGCCAATCGTCGGATCAGAAG-3'  
 (SEQ ID NO : 8) et 13Dcg 5'-  
 AGCTCTAGATCTCTAATTCTTCCGAGAAATCTCAT-3' (SEQ ID NO : 9), dans  
 35 les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus. Le  
 produit d'amplification est purifié comme précédemment puis  
 digéré avec les enzymes de restriction *SpeI/BglIII*. Le

fragment obtenu est inséré dans le vecteur pET15b modifié par insertion d'un site *SpeI* à la place du site *XhoI*, puis coupé avec les enzymes de restriction *SpeI/BamHI*. Le plasmide résultant, pWM38, possède le gène *pks13* de *C. glutamicum* fusionné à une étiquette de 18 nucléotides en 5' du gène codant pour une séquence de 6 histidines.

5 Surexpression des protéines Pks13 de *Mycobacterium tuberculosis* et *Corynebacterium glutamicum* chez *Escherichia coli*

10 Les plasmides pWM35, pWM36 et pWM38 sont transférés dans la souche d'*Escherichia coli* BL21 (DE3):pLySS (NOVAGEN).

15 Les trois souches sont inoculées dans 3 ml de milieu LB contenant du chloramphénicol (30 µg/ml) et de la kanamycine (40 µg/ml) ou de l'ampicilline (100 µg/ml) en fonction des plasmides. Les cultures sont incubées à 37°C sous agitation (250 tr/min) jusqu'à saturation.

20 Une dilution au 1/100<sup>ème</sup> de ces cultures est réalisée dans 200 ml de milieu LB contenant de la kanamycine ou de l'ampicilline. Ces nouvelles cultures sont incubées sous agitation à 37°C pendant 2h30 ( $DO_{600nm} = 0,7-0,8$ ). De l'isopropyl-thio-β-D-galactoside (IPTG) est ajouté à une concentration finale de 0,5 mM et la culture est incubée 3h à 30°C sous agitation.

25 Purification des protéines Pks13 de *Mycobacterium tuberculosis* et *Corynebacterium glutamicum*

30 Les cellules exprimant les différentes protéines Pks13 sont culottées par centrifugation à 2500 g pendant 15 min, puis reprises dans 40 ml de tampon de charge (Tris-HCl 50 mM pH=7,5, Imidazole 5 mM, NaCl 300 mM). Les cellules sont congélées à -20°C pendant 15h, puis elles subissent 2 cycles de fractionnement par centrifugation dans l'acide trifluoroacétique.

« Chelating Sepharose Fast Flow » (AMERSHAM) en FPLC (BIORAD HP duoflow). La protéine est éluée par gradient de 5 à 150 mM d'Imidazole avec un pic d'élution à 90 mM. Les fractions enrichies en protéines sont mélangées, concentrées par 5 filtration sur centriprep 30 (AMICON), et la protéine est séparée des contaminants résiduels par chromatographie d'exclusion (S-200 16/60 mm, AMERSHAM) en FPLC.

En suivant cette procédure, environ 20 mg de protéines *Pks13* de *M. tuberculosis* ou de *C. glutamicum* sont 10 obtenus.

**EXEMPLE 3 : ANALYSE BIOCHIMIQUE DE MUTANTS *Δpks13* DE CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM ET MYCOBACTERIUM SMEGMATIS**

La souche de *C. glutamicum* ATCC13032 est mise en culture comme précédemment décrit.

15 La souche de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 de type sauvage (SNAPPER et al., Mol. Microbiol. 4 : 1911-1919, 1990) est mise en culture sur un milieu LB (DIFCO) supplémenté par 0,05% de Tween 80 afin d'éviter l'agrégation.

20 Les milieux de culture sont additionnés de kanamycine, d'hygromycine, de chloramphénicol et de sucre quand nécessaire à une concentration finale de 40 µg/ml, 50 µg/ml, 15 µg/ml et 10% (p/v), respectivement.

25 L'ADN bactérien total est extrait à partir de 5 ml de culture liquide saturée comme décrit dans BELISLE et al., 1998. Le culots d'ADN est re-suspendu dans 100 µl de Tris 10 mM (pH 8).

**Construction d'un mutant de *C. glutamicum***

**Souche mutante *Δpks13* de *C. glutamicum***

30 Deux fragments d'ADN de 0,9 kb et 0,7 kb chevauchant le gène *pks13* sur ses extrémité 5' et 3' sont amplifiés par PCR à partir de l'ADN total de *C. glutamicum* en utilisant respectivement les couples d'amorces suivants :

pkdel5 : 5'-GAAATCTCGAGCCACGGCGAAA-3' (Tm=54°C)

(SEQ ID NO : 10)

35 pkdel2 : 5'-ACGATTGCCGGTCCATATTG-3' (Tm=54°C)

(SEQ ID NO : 11)

et

pkdel3: 5'-CATCCTGTTCCGCGGAACGCATGC-3' (Tm=54°C)  
(SEQ ID NO : 12)

pkdel4: 5'-CAGCATGATGGAGATCTGAGGGC-3' (Tm=54°C)  
(SEQ ID NO : 13)

5 Les conditions de PCR sont : 1 unité de Taq polymérase (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP et 0,5 µM de chaque amorce dans un volume final de 50 µl, dans les conditions recommandées par le fournisseur (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS). Le programme d'amplification  
10 est : 2 min à 94°C, puis 35 cycles de 1 min à 94°C, 30 sec à 54°C, 1 min 30 sec à 72°C, puis 1 cycle de 10 min à 72°C.

15 Ces fragments sont insérés dans le plasmide pMCS5 (MOBITEC, Göttingen, Allemagne). Une cassette de résistance à la kanamycine est insérée entre ces deux fragments PCR pour donner le plasmide pCMS5::pks. Ce plasmide est transféré dans la souche *C. glutamicum* et les transformants sont sélectionnés sur un milieu gélosé contenant de la kanamycine.

20 La Figure 3A présente schématiquement la structure génétique du locus *pks13* dans la souche de type sauvage (WT) et dans la souche mutante *Δpks13* de *C. glutamicum*. Dans cette dernière, l'allèle de type sauvage de *pks13* présent sur le chromosome est remplacé par un allèle muté contenant une délétion interne de 4,3 kb dans laquelle le gène *km* codant pour la kanamycine est inséré. Les boîtes  
25 indiquent les différents gènes du locus *pks13*. La localisation et le nom des amores utilisées pour l'analyse par PCR des souches mutantes sont indiqués par des têtes de flèche. Les produits d'amplification PCR attendus pour les différentes souches sont indiqués sous chaque structure  
30 génétique.

Les transformants *Δpks13* dans lesquels le  
mutantement déclenche une insertion d'au moins 4,3 kb  
entre les deux amores de PCR sont indiqués par un trait horizontal.

thermosensibilité qui les rend incapables de croître à des températures supérieures à 30°C contrairement au type sauvage qui produit des colonies sur milieu gélosé jusqu'à 37°C (4) une forte agrégation en culture liquide en absence de 5 détergent.

Ces transformants sont caractérisés par PCR en utilisant les amorces suivantes :

fa2 : 5'-TCTGACCACCTCCGTGAAGC-3' (Tm=55°C ou 62°C)

(SEQ ID NO : 14)

10 ac2 : 5'-GAACGAGTTCAGAGCTTC-3' (Tm=55°C ou 62°C)

(SEQ ID NO : 15)

K10 : 5'-TATTCGAATGGTTCGCTGGGTTTATC-3' (Tm=55°C)

(SEQ ID NO : 16)

K7 : 5'-TAAAAAGCTTATCGATAACCG-3' (Tm=55°C)

15 (SEQ ID NO : 17)

pk1 : 5'-GCCGTGACGGTATCTCGG-3' (Tm=55°C)

(SEQ ID NO: 18)

pk2 : 5'-CCAGGGCAGTTGCTTCAATG-3' (Tm=55°C)

(SEQ ID NO: 19)

20 La Figure 3B présente les résultats d'analyse par PCR du mutant *Δpks13* et de la souche de type sauvage (WT) de *C. glutamicum*.

#### **Souche mutante *Δpks13:pCGL2308* de *C. glutamicum***

Un plasmide de complémentation, pCGL2308, est 25 produit par l'insertion dans le vecteur pCGL482 (PEYRET et al., Mol. Microbiol. 9 : 97-109, 1993) d'un fragment de 5,3 kb de *C. glutamicum*, comprenant le gène *pks13* et la région de 417 pb en amont de ce gène, obtenu par PCR à partir de l'ADN total de *C. glutamicum* en utilisant le couple 30 d'amorces suivant :

pk3 : 5'-TCCGGAAAGATCTCACGCCGCG-3' (Tm=62°C)

(SEQ ID NO : 20)

pk4 : 5'-GCGTGCGCGCAGATCTGCTAGC-3' (Tm=62°C)

(SEQ ID NO : 21)

35 Le plasmide pCGL2308 résultant est transféré par électroporation dans la souche *Δpks13* de *C. glutamicum* et

les transformants *Δpks13:pGCL2308* sont sélectionnés sur milieu gélosé contenant de la kanamycine.

Les transformants *4pks13:pCGL2308* présentent une morphologie brillante et lisse, une vitesse de croissance intermédiaire entre la souche sauvage et la souche mutante, une incapacité à pousser à des températures supérieures à 32 °C (alors que la souche sauvage pousse à 37 °C), ainsi qu'une teneur en acide mycolique beaucoup plus faible que celle de la souche sauvage.

10 Il apparaît donc que la complémentation par le plasmide induit une réversion partielle vers le phénotype sauvage.

## Construction d'un mutant conditionnel de *M. smegmatis*

### Souche mutante PMM47 de *M. smegmatis*

15 Deux fragments d'ADN d'environ 1 kb chevauchant  
le gène *pks13* sur ses extrémités 5' et 3' sont amplifiés par  
PCR à partir de l'ADN total de *M. smegmatis* en utilisant  
respectivement les couples d'amorces suivants :

13F : 5'-GCTCTAGAGTTAAACGCTGGACCTGTCAAACCTGAAAGC-3'

20 (SEQ ID NO : 22)

13G : 5' -GGACTAGTCGTCGAAACCGACCGTCAACG-3'

(SEQ ID NO : 23)

et

13H : 5'-GGACTAGTCGGCATCTTCAACGAGTTCC-3'

25 (SEQ ID NO : 24)

13I : 5'-CCCAAGCTTGTAACTTGTGCGAAGTCCTTCCAGCC 3'

(SEQ ID NO : 25)

Les conditions de PCR sont : 3 unités de polymérase Pfu (PROMEGA, Lyon, France), 10% de diméthyl sulfoxyde ( $\text{Me}_2\text{SO}$ ), 1 mM de dNTP et 1  $\mu\text{M}$  de chaque amorce dans un volume final de 50  $\mu\text{l}$ , dans les conditions recommandées par le fabricant (réaction dans un tube à PCR).

de résistance à l'hygromycine est insérée entre ces deux fragments PCR pour donner le plasmide pDP28. Ce plasmide non réplicatif contenant le marqueur *sacB* et une copie de l'allèle muté *pks13::hyg* est transféré dans la souche *M. smegmatis* par électroporation et les transformants sont sélectionnés sur milieu gélosé contenant de l'hygromycine.

Les transformants ayant intégré le plasmide pDP28 par simple recombinaison entre les copies du type sauvage et muté du gène *pks13* sont caractérisés par PCR en utilisant les 10 amorces suivantes :

13J : 5' -CTTCCACGACATGGTCTGAT-3' (SEQ ID NO : 26)

13K : 5' -CACGATCGAGTCGAGCTCGA-3' (SEQ ID NO : 27)

H1 : 5' -AGCACCCAGCGGTTGCCGT-3' (SEQ ID NO : 28)

H2 : 5' -TGCACGACTTCGAGGTGTTCG-3' (SEQ ID NO : 29)

15 Les conditions de PCR sont : 2,5 unités de Taq polymérase (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS), 10% de diméthyl sulfoxyde (Me<sub>2</sub>SO), 1 mM de dNTP et 1 µM de chaque amorce dans un volume final de 50 µl, dans les conditions recommandées par le fournisseur (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS). Le 20 programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 62°C, 2 min 30 sec à 72°C, puis 1 cycle de 10 min à 72°C. Une souche dénommée PMM47 de *M. smegmatis* est sélectionnée, dans laquelle le plasmide pDP28 s'est inséré au locus *pks13* par simple recombinaison. Des 25 étalements à différentes températures (25°C, 32°C ou 37°C) d'une culture de PMM47, sur un milieu contenant 10% de sucre et de l'hygromycine produit des clones avec une mutation dans le gène *sacB* mais aucun événement de seconde recombinaison pouvant produire une souche portant seulement 30 l'allèle muté *pks13::hyg* n'est sélectionné.

35 Ce résultat indique que le gène *pks13* est essentiel pour la croissance des mycobactéries. Afin de confirmer cette hypothèse, une seconde copie du gène *pks13* de type sauvage est transférée dans PMM47 clonée sur un vecteur mycobactérien thermosensible.

### **Souche mutante thermosensible PMM48:pDP32 de *M. smegmatis***

Pour produire le plasmide de complémentation pDP32, le gène *pks13* est amplifié par PCR à partir de l'ADN total de *M. smegmatis* en utilisant les amorces 13R 5'-

Les conditions de PCR sont : 3 unités d'ADN polymérase Pfu (PROMEGA, Lyon, France), 10% de diméthyl sulfoxyde (Me<sub>2</sub>SO), 1 mM de DNTP, et 1 µM de chaque amorce dans un volume final de 50 µl, dans les conditions recommandées par le fournisseur (PROMEGA, Lyon, France). Le programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 58°C, 5 min à 72°C, puis 10 min à 72°C.

15 Le gène *pks13* est inséré dans un plasmide mycobactérien thermosensible dérivé du plasmide pCG63 (GUILHOT et al., FEMS Microbiol. Letter 98 : 181-186, 1992) et contenant une cassette d'expression mycobactérienne, avec un promoteur mycobactérien, pBlaF\*, en amont d'un site 20 multiple de clonage lui-même en amont d'un terminateur de transcription (LE DANTEC et al., J. Bacteriol. 183 : 2157-2164, 2001). Le plasmide pDP32 résultant est transféré par électroporation dans la souche PMM47 de *M. smegmatis* et les transformants sont sélectionnés sur milieu gélosé contenant 25 de la kanamycine et de l'hygromycine. La seconde recombinaison au locus chromosomique *pks13* est sélectionnée par également d'une culture liquide de ces transformants à 30°C sur milieu gélosé contenant de la kanamycine, de l'hygromycine et du sucre à 30°C. Les colonies sont 30 criblées par PCR en utilisant les amorces suivantes :

13J : 5' -CTTCCACGACATGCTCTGAT-3' (SEQ ID NO : 36)

13K . 54-03000000000000000000000000000000 (REF ID: W4437)

un volume final de 50  $\mu$ l, dans les conditions recommandées par le fournisseur (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS). Le programme d'amplification est : 5 min à 94°C, puis 30 cycles de 1 min à 94°C, 1 min à 62°C, 2 min 30 sec à 72°C, puis 5 1 cycle de 10 min à 72°C.

La Figure 4A présente schématiquement la structure génétique du locus *pks13* obtenu au cours de la construction du mutant conditionnel PMM48:pDP32 de *M. smegmatis*. Les boîtes indiquent les différents gènes du locus 10 *pks13*. La localisation et le nom des amorces utilisées pour l'analyse par PCR des souches mutantes sont indiqués par des têtes de flèche. Les produits d'amplification PCR attendus pour les différentes souches sont indiqués sous chaque structure génétique.

15 La Figure 4B présente les résultats d'analyse par PCR du mutant conditionnel PMM48:pDP32 de *M. smegmatis* et de ses souches parentales PMM47 et mc<sup>2</sup>155 (WT).

20 En utilisant ces conditions, 8% des colonies sélectionnées Hyg<sup>R</sup>, Km<sup>R</sup>, Suc<sup>R</sup> sont le résultat d'un échange allélique ; les autres clones étant le résultat d'une mutation du gène *sacB*.

25 La souche dénommée PMM48:pDP32, dans laquelle la copie chromosomique de type sauvage du gène *pks13* est remplacée par l'allèle muté *pks::hyg* et une copie du gène *pks13* fonctionnelle se trouve sur un plasmide thermosensible, est sélectionnée pour une analyse phénotypique. Les résultats sont représentés dans la Figure 4C.

Légende de la Figure 4C :

30  $\square$  = souche recombinante PMM48:pDP32 de *M. smegmatis*  
◆ = souche de type sauvage (WT)

Des étalements de cette souche recombinante sur milieu gélosé contenant de l'hygromycine à 32°C ou 42°C révèlent qu'elle est incapable de former des colonies à température élevée. En culture liquide à 32°C, cette souche 35 croît aussi vite que la souche de type sauvage, une température permissive pour le plasmide pDP32. Cependant, lorsque la culture est placée à 42°C, une température non

permissive pour le plasmide pDP32, le nombre de bactéries viables augmente jusqu'au temps 12h à 24h post-inoculation, puis demeure stable au cours des 24 heures suivantes avant de décroître ; les seules bactéries viables sont celles qui ont 5 conservé une copie du plasmide de complémentation.

Ces résultats montrent que le gène pks13 est essentiel pour la survie de *M. smegmatis*, comme attendu d'un gène codant pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse des acides mycoliques.

10 **Analyse biochimique des mutants  $\Delta pks13$  de *C. glutamicum* et PMM48:pDP32 de *M. smegmatis***

**Protocole d'analyse**

Les souches de *C. glutamicum* sont mises en culture jusqu'en phase exponentielle et marquées avec de 15 l'acétate [ $^{14}\text{C}$ ] 0,5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  (activité spécifique de 54 mCi/mmol ; ICN, Orsay, France) pendant 3h. Pour le radiomarquage du mutant conditionnel de *M. smegmatis* à température non permissive, PMM48:pDP32 et la souche de type sauvage mc<sup>2</sup>155 sont mises en culture à 30°C. Ces cultures 20 sont ensuite diluées dans du milieu frais à une  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,005$  et incubées à 42°C jusqu'à une  $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,3$ . Les cellules sont ensuite marquées pendant 3h avec de l'acétate [ $^{14}\text{C}$ ] 0,5  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ .

Les acides gras sont préparés à partir des 25 cellules marquées et séparés par chromatographie sur couche mince sur Durasil 25 en utilisant du dichlorométhane ou un mélange éther/diéthyléther (9:1) comme éluant comme décrit dans LAVAL et al. (Anal. Chem. 73 : 4537-4544, 2001). Les composés marqués sont quantifiés sur un Phosphomalger 30 (AMERSHAM BIOSCIENCES).

Pour les analyses par chromatographie en phase

REVERSE MINCE : une colonne de chromatographie à base de

gaz de réaction (Cl/NH<sub>3</sub>), couplé avec un chromatographe en phase gazeuse Hewlett-Packard 5890 series II associé à une colonne OV1 similaire (0,30 mm x 12 m).

## Résultats

### 5 Mutants $\Delta pks13$ et $\Delta pks13:PCGL2308$ de *C. glutamicum*

La Figure 3C illustre le résultat de l'analyse des acides gras libérés après saponification à partir de la souche de type sauvage (WT) et des mutants  $\Delta pks13$  et  $\Delta pks13:PCGL2308$  de *C. glutamicum*. L'analyse par chromatographie sur couche mince de ces produits révèle que les spots correspondant aux acides mycoliques ou à la palmitone, un produit de dégradation de l'intermédiaire  $\beta$ -ceto acyl résultant de la réaction de condensation, ne sont plus détectables chez les mutants. Cette observation est confirmée par l'analyse en GC-MS qui démontre que le mutant  $\Delta pks13$  de *C. glutamicum* ne synthétise plus d'acides mycoliques mais produit une quantité similaire d'acides gras C16-C18, le précurseur de mycolate, de celle de la souche de type sauvage (données non représentées). Cette production d'acides mycoliques est partiellement restaurée suite au transfert dans la souche mutante  $\Delta pks13$  d'un plasmide portant le gène *pks13* fonctionnel de *C. glutamicum*; ce qui démontre que ces phénotypes sont effectivement dus à la délétion de *pks13*. La restauration partielle suggère soit que l'expression de *pks13* par le plasmide n'est pas du même niveau que celle dans la souche de type sauvage, soit que l'insertion chromosomique de la cassette kanamycine exerce un effet polaire sur l'expression du gène *accD4*, ou les deux.

En outre, dans les Mycolatas, les acides mycoliques sont supposés contribuer à la bicouche lipidique qui forme un homologue fonctionnel à la membrane externe des bactéries Gram-négative. Chez les coryn'bactéries et les mycobactéries, un plan de cryofracture se propage entre les deux couches de cette pseudo membrane externe. Comme attendu, la Figure 3D montre la perte de ce plan de fracture dans la souche mutant  $\Delta pks13$  de *C. glutamicum* alors qu'il est clairement visible dans la souche de type sauvage, ce qui

suggère que la bicouche lipidique composée majoritairement d'acides mycoliques n'est plus présente dans le mutant.

Ces résultats montrent que le mutant *Δpks13* de *C. glutamicum* est bien dépourvu d'une enzyme essentielle dans la biosynthèse les acides mycoliques.

Mutant PMM48:pDP32 de *M. smegmatis*

La Figure 4D illustre le résultat de l'analyse des acides gras libérés après saponification à partir de la souche de type sauvage de *M. smegmatis* et du mutant conditionnel PMM48:pDP32, après croissance à température permissive (30°C) ou non permissive (42°C). Le rapport mycolates/acides gras à chaîne courte est quantifié pour le mutant PMM48:pDP32 et divisé par celui obtenu pour la souche de type sauvage cultivée dans les mêmes conditions. Le graphe montre qu'après transfert à 42°C, le contenu moyen en mycolate dans le mutant PMM48:pDP32 est diminué de plus de 60%. Comme attendu, cette synthèse n'est pas complètement stoppée dans la culture du fait que la population bactérienne restante conservant le plasmide de complémentation non réplicatif produit des acides mycoliques.

Ces résultats montrent que le gène *pks13* est impliqué dans la biosynthèse des acides mycoliques chez *M. smegmatis*.

## REVENDICATIONS

1) Protéine purifiée, caractérisée en ce que :

a) elle possède au moins 40% d'identité, sur la totalité de sa séquence, avec la protéine Pks13 de *M. tuberculosis* ;

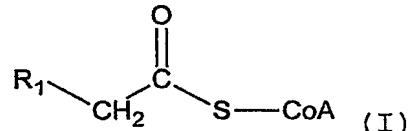
5 b) elle possède un domaine acyl transférase (pfam00698), un domaine kétoacylsynthase (pfam02801 ou pfam00109), au moins un domaine acyl carrier protein (COG0331 ou COG0304,), et un domaine thioestérase (COG3319 ou pfam00975)

c) elle catalyse une condensation de Claisen entre une

10 molécule d'acyl-CoA et une molécule d'acylmalonyl-CoA.

2) Protéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle catalyse une condensation de Claisen entre :

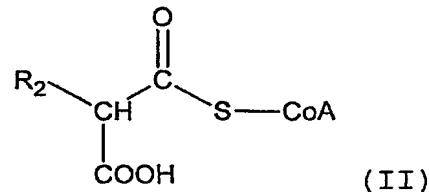
a) une molécule d'acyl-CoA de formule I :



dans laquelle R1 est une chaîne comprenant de 6 à 68 atomes de carbone, pouvant comporter une ou plusieurs doubles liaisons C=C, et/ou un ou plusieurs cycles cis/trans-cyclopropane, et/ou un ou plusieurs groupes  $\text{---CH}_3$   $\text{---CH---O---C---}$  et/ou pouvant porter un ou plusieurs groupes latéraux choisis parmi  $-\text{CH}_3$ ,  $=\text{O}$ ,  $-\text{O---CH}_3$  ;

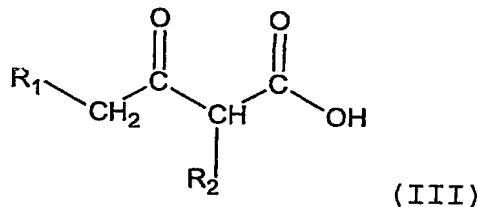
et

b) une molécule d'acylmalonyl-CoA de formule II :



25 dans laquelle R2 est un alcane linéaire comprenant de 10 à 24 atomes de carbone ;

pour former un intermédiaire  $\beta$ -ceto acyl de formule III :



dans laquelle  $R_1$  et  $R_2$  sont telles que définis ci-dessus.

3) Protéine selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle présente au moins 70% d'identité avec la séquence SEQ ID NO : 1 de *Mycobacterium tuberculosis*.

4) Protéine selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle présente au moins 70% d'identité de séquence avec la séquence SEQ ID NO : 10 2 de *Corynebacterium glutamicum*.

5) Vecteur d'expression, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence polynucléotidique codant pour une protéine selon une quelconque des revendications 1 à 4.

15 6) Cellule-hôte, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur d'expression selon la revendication 5.

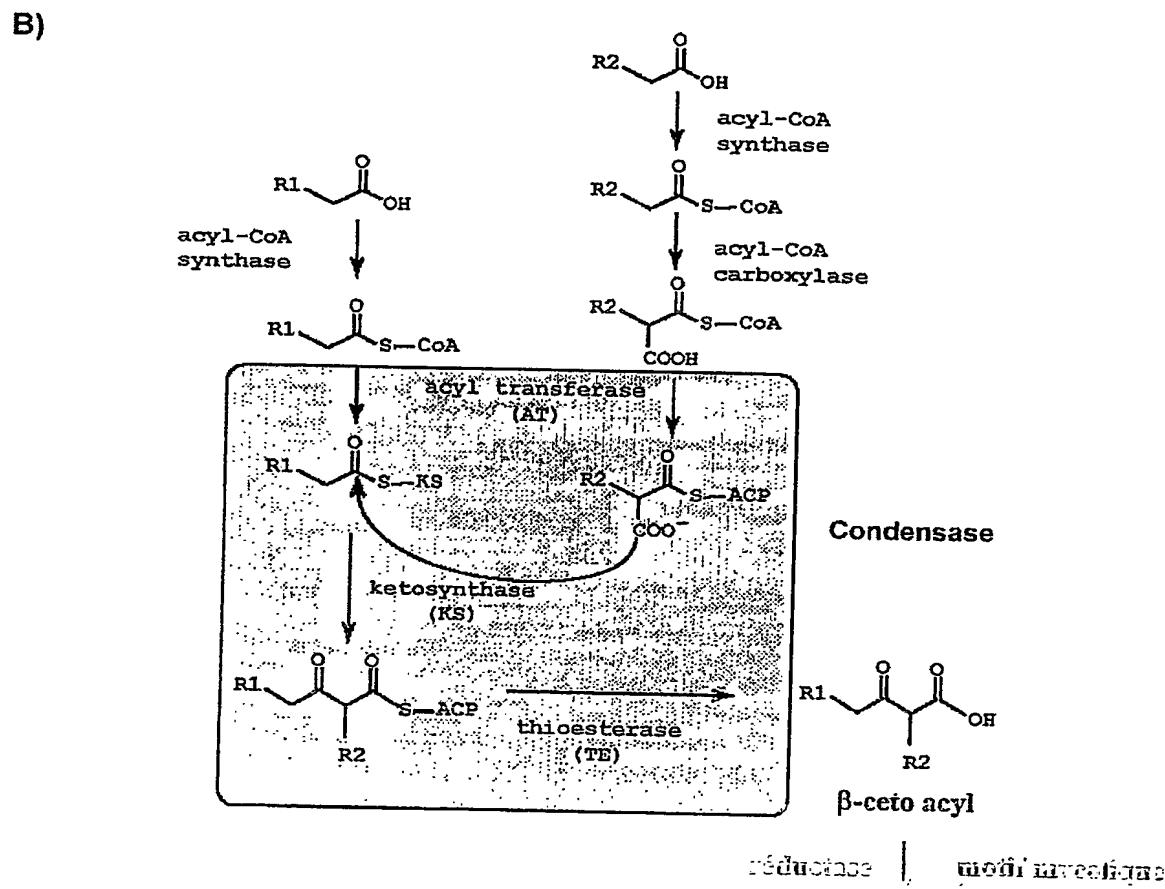
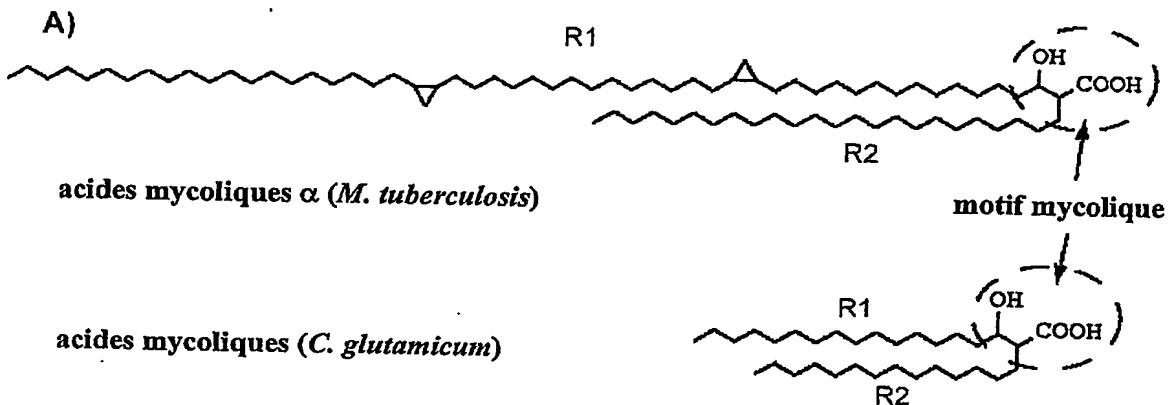
7) Cellule-hôte selon la revendication 6,  
caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule procarvote.

20 8) Procédé d'obtention d'une protéine selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en culture d'une cellule hôte selon une quelconque des revendications 6 ou 7 ; et
- la purification de ladite protéine à partir de ladite culture.

10) Utilisation d'une protéine selon une quelconque des revendications 1 à 4, pour le criblage d'antibiotiques actifs sur les mycolatas.

11) Utilisation selon la revendication 10, pour  
5 le criblage d'antibiotiques actifs sur les mycobactéries.



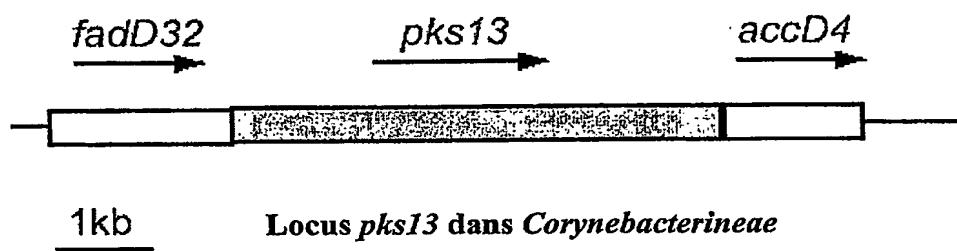
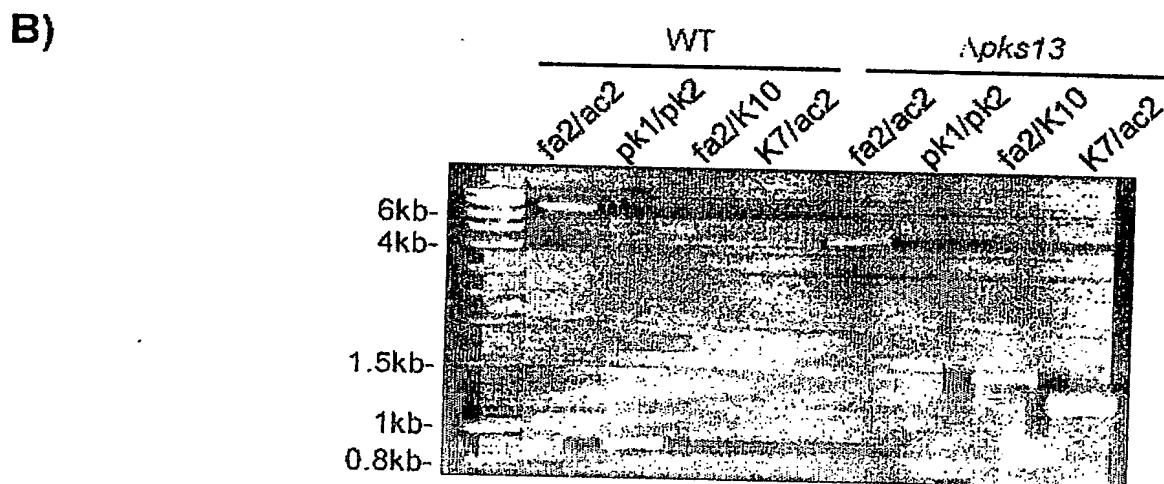
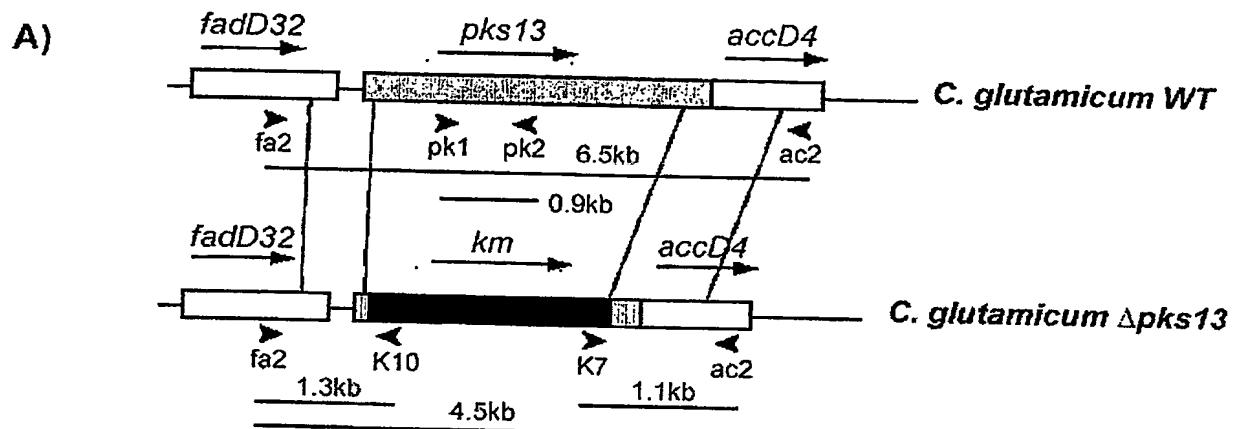


FIG. 2



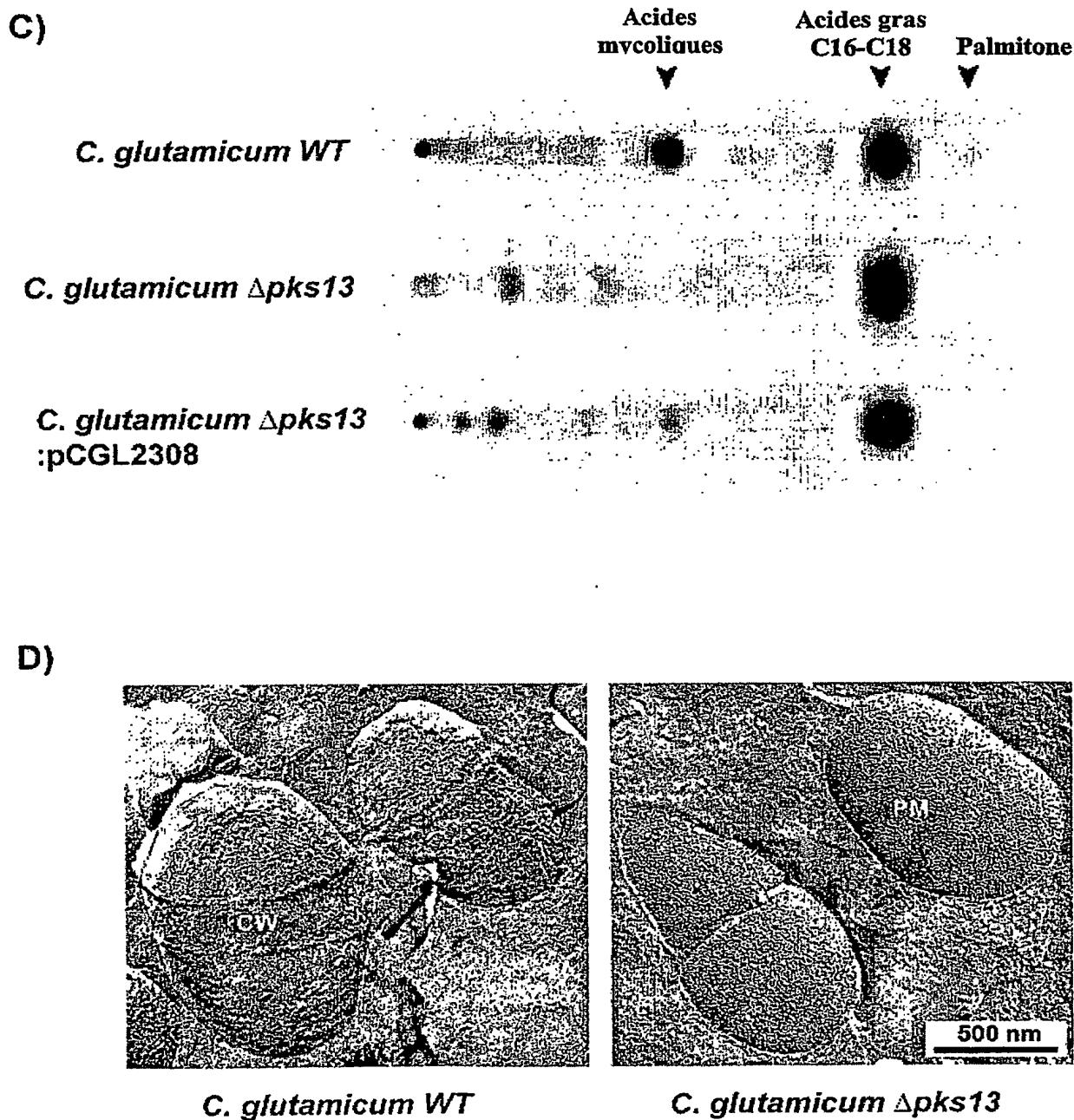
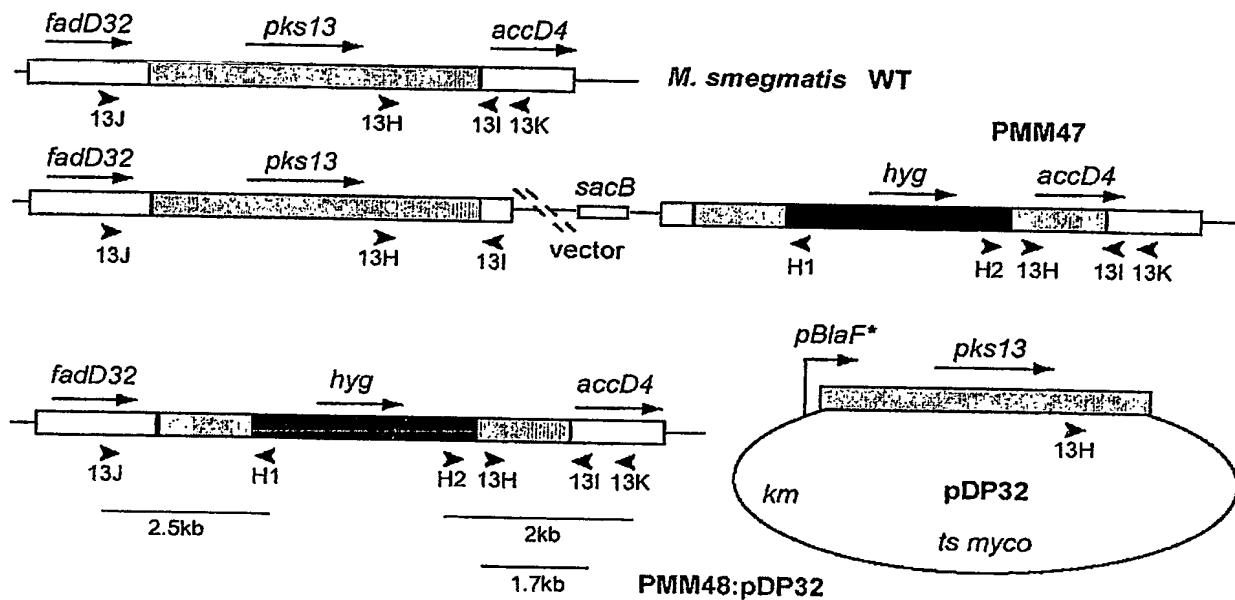
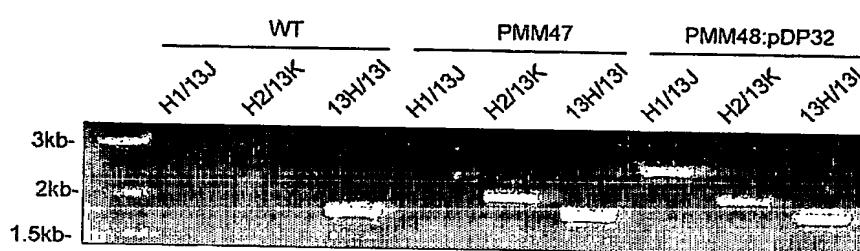


FIG.3 (suite)

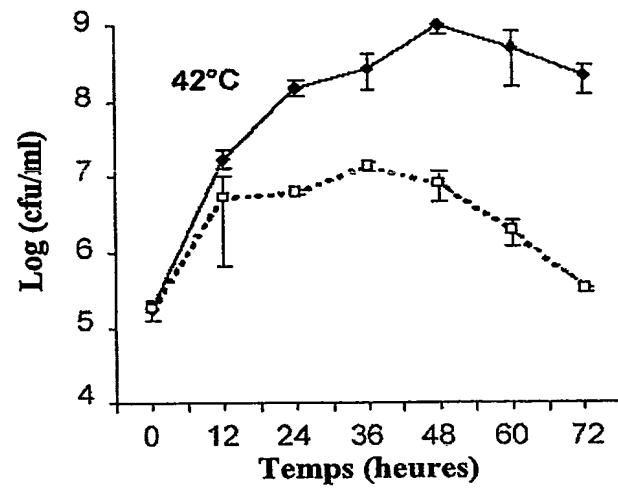
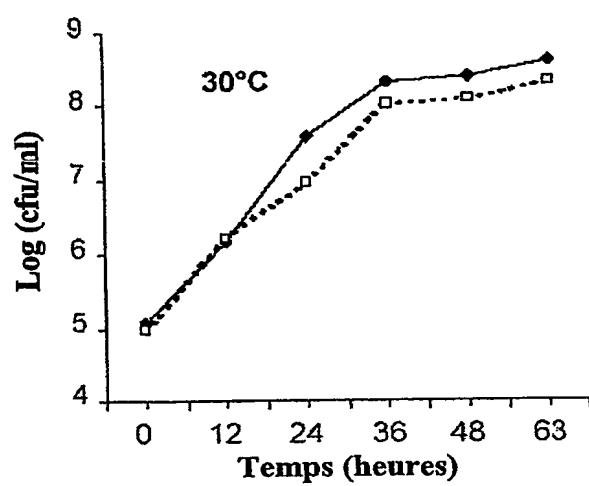
A)



B)



C)



D)

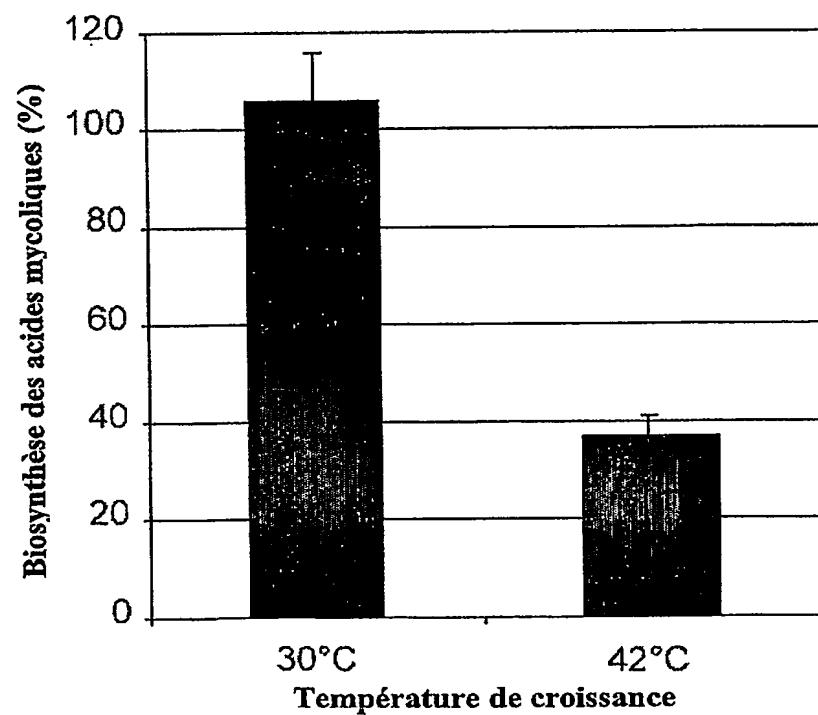


FIG. 4 (SUITE)

## SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)  
UNIVERSITE PARIS SUD XI  
GUILHOT, Christophe  
DAFFE, Mamadou  
HOUSSIN, Christine  
PORTEVIN, Damien  
DE SOUSA, Célia

<120> UTILISATION DE LA PROTEINE PKS13 CODANT POUR LA CONDENSASE  
DES ACIDES MYCOLIQUES DES MYCOBACTERIES ET GENRES APPARENTES  
COMME CIBLE D'ANTIBIOTIQUES

<130> MJPbv644-112

<160> 31

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 1733  
<212> PRT  
<213> *Mycobacterium tuberculosis*

<400> 1  
Met Ala Asp Val Ala Glu Ser Gln Glu Asn Ala Pro Ala Glu Arg Ala  
1 5 10 15

Glu Leu Thr Val Pro Glu Met Arg Gln Trp Leu Arg Asn Trp Val Gly  
20 25 30

Lys Ala Val Gly Lys Ala Pro Asp Ser Ile Asp Glu Ser Val Pro Met  
35 40 45

Val Glu Leu Gly Leu Ser Ser Arg Asp Ala Val Ala Met Ala Ala Asp  
50 55 60

Ile Glu Asp Leu Thr Gly Val Thr Leu Ser Val Ala Val Ala Phe Ala  
65 70 75 80

His Pro Thr Ile Glu Ser Leu Ala Thr Arg Ile Ile Glu Gly Glu Pro  
85 90 95

Glu Thr Asp Leu Ala Gly Asp Asp Ala Glu Asp Trp Ser Arg Thr Gly  
100 105 110

Pro Ala Glu Arg Val Asp Ile Ile Ile Val Gly Leu Ser Thr Asp Val

Leu Glu Glu Pro Arg Leu Ala Ala Arg Val Ala Gly Ala Arg Thr Arg  
 165 170 175  
 Gly Gly Tyr Leu Lys Asp Ile Lys Gly Phe Asp Ser Glu Phe Phe Ala  
 180 185 190  
 Val Ala Lys Thr Glu Ala Asp Asn Ile Asp Pro Gln Gln Arg Met Ala  
 195 200 205  
 Leu Glu Leu Thr Trp Glu Ala Leu Glu His Ala Arg Ile Pro Ala Ser  
 210 215 220  
 Ser Leu Arg Gly Gln Ala Val Gly Val Tyr Ile Gly Ser Ser Thr Asn  
 225 230 235 240  
 Asp Tyr Ser Phe Leu Ala Val Ser Asp Pro Thr Val Ala His Pro Tyr  
 245 250 255  
 Ala Ile Thr Gly Thr Ser Ser Ile Ile Ala Asn Arg Val Ser Tyr  
 260 265 270  
 Phe Tyr Asp Phe His Gly Pro Ser Val Thr Ile Asp Thr Ala Cys Ser  
 275 280 285  
 Ser Ser Leu Val Ala Ile His Gln Gly Val Gln Ala Leu Arg Asn Gly  
 290 295 300  
 Glu Ala Asp Val Val Val Ala Gly Gly Val Asn Ala Leu Ile Thr Pro  
 305 310 315 320  
 Met Val Thr Leu Gly Phe Asp Glu Ile Gly Ala Val Leu Ala Pro Asp  
 325 330 335  
 Gly Arg Ile Lys Ser Phe Ser Ala Asp Ala Asp Gly Tyr Thr Arg Ser  
 340 345 350  
 Glu Gly Gly Met Leu Val Leu Lys Arg Val Asp Asp Ala Arg Arg  
 355 360 365  
 Asp Gly Asp Ala Ile Leu Ala Val Ile Ala Gly Ser Ala Val Asn His  
 370 375 380  
 Asp Gly Arg Ser Asn Gly Leu Ile Ala Pro Asn Gln Asp Ala Gln Ala  
 385 390 395 400  
 Asp Val Leu Arg Arg Ala Tyr Lys Asp Ala Gly Ile Asp Pro Arg Thr  
 405 410 415  
 Val Asp Tyr Ile Glu Ala His Gly Thr Gly Thr Ile Leu Gly Asp Pro  
 420 425 430  
 Ile Glu Ala Glu Ala Leu Gly Arg Val Val Gly Arg Gly Arg Pro Ala  
 435 440 445  
 Asp Arg Pro Ala Leu Leu Gly Ala Val Lys Thr Asn Val Gly His Leu  
 450 455 460

Glu Ser Ala Ala Gly Ala Ala Ser Met Ala Lys Val Val Leu Ala Leu  
 465 470 475 480  
 Gln His Asp Lys Leu Pro Pro Ser Ile Asn Phe Ala Gly Pro Ser Pro  
 485 490 495  
 Tyr Ile Asp Phe Asp Ala Met Arg Leu Lys Met Ile Thr Thr Pro Thr  
 500 505 510  
 Asp Trp Pro Arg Tyr Gly Gly Tyr Ala Leu Ala Gly Val Ser Ser Phe  
 515 520 525  
 Gly Phe Gly Gly Ala Asn Ala His Val Val Val Arg Glu Val Leu Pro  
 530 535 540  
 Arg Asp Val Val Glu Lys Glu Pro Glu Pro Glu Pro Glu Pro Lys Ala  
 545 550 555 560  
 Ala Ala Glu Pro Ala Glu Ala Pro Thr Leu Ala Gly His Ala Leu Arg  
 565 570 575  
 Phe Asp Glu Phe Gly Asn Ile Ile Thr Asp Ser Ala Val Ala Glu Glu  
 580 585 590  
 Pro Glu Pro Glu Leu Pro Gly Val Thr Glu Glu Ala Leu Arg Leu Lys  
 595 600 605  
 Glu Ala Ala Leu Glu Glu Leu Ala Ala Gln Glu Val Thr Ala Pro Leu  
 610 615 620  
 Val Pro Leu Ala Val Ser Ala Phe Leu Thr Ser Arg Lys Lys Ala Ala  
 625 630 635 640  
 Ala Ala Glu Leu Ala Asp Trp Met Gln Ser Pro Glu Gly Gln Ala Ser  
 645 650 655  
 Ser Leu Glu Ser Ile Gly Arg Ser Leu Ser Arg Arg Asn His Gly Arg  
 660 665 670  
 Ser Arg Ala Val Val Leu Ala His Asp His Asp Glu Ala Ile Lys Gly  
 675 680 685  
 Leu Arg Ala Val Ala Ala Gly Lys Gln Ala Pro Asn Val Phe Ser Val  
 690 695 700  
 Asp Gly Pro Val Thr Thr Gly Pro Val Trp Val Leu Ala Gly Phe Gly  
 705 710 715 720

Ile Glu Thr Thr Gln Val Thr Ile Phe Ala Ile Gln Ile Ala Leu Gly  
 770 775 780

Glu Leu Leu Arg His His Gly Ala Lys Pro Ala Ala Val Ile Gly Gln  
 785 790 795 800

Ser Leu Gly Glu Ala Ala Ser Ala Tyr Phe Ala Gly Gly Leu Ser Leu  
 805 810 815

Arg Asp Ala Thr Arg Ala Ile Cys Ser Arg Ser His Leu Met Gly Glu  
 820 825 830

Gly Glu Ala Met Leu Phe Gly Glu Tyr Ile Arg Leu Met Ala Leu Val  
 835 840 845

Glu Tyr Ser Ala Asp Glu Ile Arg Glu Val Phe Ser Asp Phe Pro Asp  
 850 855 860

Leu Glu Val Cys Val Tyr Ala Ala Pro Thr Gln Thr Val Ile Gly Gly  
 865 870 875 880

Pro Pro Glu Gln Val Asp Ala Ile Leu Ala Arg Ala Glu Ala Glu Gly  
 885 890 895

Lys Phe Ala Arg Lys Phe Ala Thr Lys Gly Ala Ser His Thr Ser Gln  
 900 905 910

Met Asp Pro Leu Leu Gly Glu Leu Thr Ala Glu Leu Gln Gly Ile Lys  
 915 920 925

Pro Thr Ser Pro Thr Cys Gly Ile Phe Ser Thr Val His Glu Gly Arg  
 930 935 940

Tyr Ile Lys Pro Gly Gly Glu Pro Ile His Asp Val Glu Tyr Trp Lys  
 945 950 955 960

Lys Gly Leu Arg His Ser Val Tyr Phe Thr His Gly Ile Arg Asn Ala  
 965 970 975

Val Asp Ser Gly His Thr Thr Phe Leu Glu Leu Ala Pro Asn Pro Val  
 980 985 990

Ala Leu Met Gln Val Ala Leu Thr Thr Ala Asp Ala Gly Leu His Asp  
 995 1000 1005

Ala Gln Leu Ile Pro Thr Leu Ala Arg Lys Gln Asp Glu Val Ser Ser  
 1010 1015 1020

Met Val Ser Thr Met Ala Gln Leu Tyr Val Tyr Gly His Asp Leu Asp  
 1025 1030 1035 1040

Ile Arg Thr Leu Phe Ser Arg Ala Ser Gly Pro Gln Asp Tyr Ala Asn  
 1045 1050 1055

Ile Pro Pro Thr Arg Phe Lys Arg Lys Glu His Trp Leu Pro Ala His  
 1060 1065 1070

Phe Ser Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Met Pro Gly Thr His Val Ala Leu  
1075 1080 1085

Pro Asp Gly Arg His Val Trp Glu Tyr Ala Pro Arg Asp Gly Asn Val  
1090 1095 1100

Asp Leu Ala Ala Leu Val Arg Ala Ala Ala His Val Leu Pro Asp  
1105 1110 1115 1120

Ala Gln Leu Thr Ala Ala Glu Gln Arg Ala Val Pro Gly Asp Gly Ala  
1125 1130 1135

Arg Leu Val Thr Thr Met Thr Arg His Pro Gly Gly Ala Ser Val Gln  
1140 1145 1150

Val His Ala Arg Ile Asp Glu Ser Phe Thr Leu Val Tyr Asp Ala Leu  
1155 1160 1165

Val Ser Arg Ala Gly Ser Glu Ser Val Leu Pro Thr Ala Val Gly Ala  
1170 1175 1180

Ala Thr Ala Ile Ala Val Ala Asp Gly Ala Pro Val Ala Pro Glu Thr  
1185 1190 1195 1200

Pro Ala Glu Asp Ala Asp Ala Glu Thr Leu Ser Asp Ser Leu Thr Thr  
1205 1210 1215

Arg Tyr Met Pro Ser Gly Met Thr Arg Trp Ser Pro Asp Ser Gly Glu  
1220 1225 1230

Thr Ile Ala Glu Arg Leu Gly Leu Ile Val Gly Ser Ala Met Gly Tyr  
1235 1240 1245

Glu Pro Glu Asp Leu Pro Trp Glu Val Pro Leu Ile Glu Leu Gly Leu  
1250 1255 1260

Asp Ser Leu Met Ala Val Arg Ile Lys Asn Arg Val Glu Tyr Asp Phe  
1265 1270 1275 1280

Asp Leu Pro Pro Ile Gln Leu Thr Ala Val Arg Asp Ala Asn Leu Tyr  
1285 1290 1295

Asn Val Glu Lys Leu Ile Glu Tyr Ala Val Glu His Arg Asp Glu Val  
1300 1305 1310

Gln Gln Leu His Glu His Gln Lys Thr Gln Thr Ala Glu Glu Ile Ala  
1315 1320 1325

1365	1370	1375
Asp Ala Ala Glu Arg Val Thr Phe Ala Thr Trp Ala Ile Val Thr Gly		
1380	1385	1390
Lys Ser Pro Gly Gly Ile Phe Asn Glu Leu Pro Arg Leu Asp Asp Glu		
1395	1400	1405
Ala Ala Ala Lys Ile Ala Gln Arg Leu Ser Glu Arg Ala Glu Gly Pro		
1410	1415	1420
Ile Thr Ala Glu Asp Val Leu Thr Ser Ser Asn Ile Glu Ala Leu Ala		
1425	1430	1435
Asp Lys Val Arg Thr Tyr Leu Glu Ala Gly Gln Ile Asp Gly Phe Val		
1445	1450	1455
Arg Thr Leu Arg Ala Arg Pro Glu Ala Gly Gly Lys Val Pro Val Phe		
1460	1465	1470
Val Phe His Pro Ala Gly Gly Ser Thr Val Val Tyr Glu Pro Leu Leu		
1475	1480	1485
Gly Arg Leu Pro Ala Asp Thr Pro Met Tyr Gly Phe Glu Arg Val Glu		
1490	1495	1500
Gly Ser Ile Glu Glu Arg Ala Gln Gln Tyr Val Pro Lys Leu Ile Glu		
1505	1510	1515
Met Gln Gly Asp Gly Pro Tyr Val Leu Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly		
1525	1530	1535
Val Leu Ala Tyr Ala Cys Ala Ile Gly Leu Arg Arg Leu Gly Lys Asp		
1540	1545	1550
Val Arg Phe Val Gly Leu Ile Asp Ala Val Arg Ala Gly Glu Glu Ile		
1555	1560	1565
Pro Gln Thr Lys Glu Glu Ile Arg Lys Arg Trp Asp Arg Tyr Ala Ala		
1570	1575	1580
Phe Ala Glu Lys Thr Phe Asn Val Thr Ile Pro Ala Ile Pro Tyr Glu		
1585	1590	1595
Gln Leu Glu Glu Leu Asp Asp Glu Gly Gln Val Arg Phe Val Leu Asp		
1605	1610	1615
Ala Val Ser Gln Ser Gly Val Gln Ile Pro Ala Gly Ile Ile Glu His		
1620	1625	1630
Gln Arg Thr Ser Tyr Leu Asp Asn Arg Ala Ile Asp Thr Ala Gln Ile		
1635	1640	1645
Gln Pro Tyr Asp Gly His Val Thr Leu Tyr Met Ala Asp Arg Tyr His		
1650	1655	1660

Asp Asp Ala Ile Met Phe Glu Pro Arg Tyr Ala Val Arg Gln Pro Asp  
1665 1670 1675 1680

Gly Gly Trp Gly Glu Tyr Val Ser Asp Leu Glu Val Val Pro Ile Gly  
1685 1690 1695

Gly Glu His Ile Gln Ala Ile Asp Glu Pro Ile Ile Ala Lys Val Gly  
1700 1705 1710

Glu His Met Ser Arg Ala Leu Gly Gln Ile Glu Ala Asp Arg Thr Ser  
1715 1720 1725

Glu Val Gly Lys Gln  
1730

<210> 2  
<211> 1610  
<212> PRT  
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<400> 2  
Met Glu Gln Ser Gln Ser Ser Asp Gln Lys Met Thr Val Glu Gln Val  
1 5 10 15

Arg Thr Trp Leu Arg Asp Trp Val Val Arg Thr Thr Gly Ile Pro Val  
20 25 30

Glu Glu Val Thr Asp Asp Lys Ala Met Glu Thr Phe Gly Leu Ser Ser  
35 40 45

Arg Asp Val Val Val Leu Ser Gly Glu Leu Glu Asn Leu Leu Asp Thr  
50 55 60

Ser Leu Asp Ala Thr Ile Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr Ile Arg Ser Leu  
65 70 75 80

Ala Gln Arg Leu Val Glu Gly Glu Pro Arg Arg Ala His Thr Gln Arg  
85 90 95

Glu Leu Asn Phe Ser Ala Val Ser Asp Ser Pro Gly Ser His Asp Ile  
100 105 110

Ala Val Val Gly Met Ala Ala Arg Tyr Pro Gly Ala Glu Ser Leu Glu  
115 120 125

Rep. Max. The U.S. Law Enf. Com. has been given the right to inspect all the ships in the port.

Ser Phe Asp Ala Glu Phe Phe Gly Leu Ser Pro Leu Glu Ala Ala Asn  
 180 185 190  
 Met Asp Pro Gln Gln Arg Ile Leu Leu Glu Leu Thr Trp Glu Ala Leu  
 195 200 205  
 Glu Tyr Ala Arg Ile Ala Pro Asn Thr Leu Arg Gly Glu Ala Val Gly  
 210 215 220  
 Val Phe Ile Gly Ser Ser Asn Asn Asp Tyr Gly Met Met Ile Ala Ala  
 225 230 235 240  
 Asp Pro Ala Glu Ala His Pro Tyr Ala Leu Thr Gly Thr Ser Ser Ala  
 245 250 255  
 Ile Val Ala Asn Arg Ile Asn Tyr Ala Phe Asp Phe Arg Gly Pro Ser  
 260 265 270  
 Val Asn Val Asp Thr Ala Cys Ser Ser Ser Leu Val Ala Val His Gln  
 275 280 285  
 Ala Val Arg Ala Leu Arg Asn Gly Glu Ala Asp His Ala Ile Ala Gly  
 290 295 300  
 Gly Val Asn Ile Leu Ala Ser Pro Phe Val Thr Thr Ala Phe Ala Glu  
 305 310 315 320  
 Leu Gly Val Ile Ser Pro Thr Gly Lys Ile His Ala Phe Ser Asp Asp  
 325 330 335  
 Ala Asp Gly Phe Val Arg Ser Asp Gly Ala Gly Val Val Val Leu Lys  
 340 345 350  
 Arg Val Asp Asp Ala Ile Arg Asp Gly Asp Lys Ile Ile Gly Val Ile  
 355 360 365  
 Lys Gly Ser Ala Val Asn Ser Asp Gly His Ser Asn Gly Leu Thr Ala  
 370 375 380  
 Pro Asn Pro Asp Ala Gln Val Asp Val Leu Gln Arg Ala Tyr Val Asp  
 385 390 395 400  
 Ala Gln Val Asp Pro Thr Thr Val Asp Tyr Val Glu Ala His Gly Thr  
 405 410 415  
 Gly Thr Ile Leu Gly Asp Pro Ile Glu Ala Thr Ala Leu Gly Ala Val  
 420 425 430  
 Leu Gly Tyr Gly Arg Asp Ala Ser Thr Pro Thr Leu Leu Gly Ser Ala  
 435 440 445  
 Lys Ser Asn Phe Gly His Thr Glu Ser Ala Ala Gly Ile Ala Gly Val  
 450 455 460  
 Ile Lys Val Leu Leu Ala Leu Gln Asn Lys Thr Leu Pro Pro Thr Val  
 465 470 475 480

Asn Phe Ala Gly Pro Asn Arg Tyr Ile Asp Phe Asp Ala Glu Arg Leu  
485 490 495

Glu Val Val Glu Asp Pro Arg Glu Trp Pro Glu Tyr Asn Gly His Ala  
500 505 510

Val Ala Gly Val Ser Ala Phe Gly Phe Gly Gly Thr Asn Ala His Val  
515 520 525

Val Ile Ser Glu Tyr Asn Ala Glu Asp Tyr Glu Thr Arg Ala Pro Lys  
530 535 540

Glu Ala Leu Leu Pro Asp Gln Gln Val Ala Leu Pro Val Ser Gly His  
545 550 555 560

Leu Pro Ser Arg Arg Arg Gln Ala Ala Ala Asp Leu Ala Asp Phe Leu  
565 570 575

Glu Gly Arg Lys Asp Cys Asp Leu Thr Pro Val Ala Arg Ala Leu Ala  
580 585 590

Gly Arg Asn His Gly Arg Ser Arg Ala Val Val Leu Ala Ser Thr Ile  
595 600 605

Glu Glu Ala Val Lys Arg Leu Arg Gln Val Ala Glu Gly Lys Val Ser  
610 615 620

Val Gly Ile Ser Ala Ala Asp Ser Pro Ala Ala Asn Gly Pro Val Phe  
625 630 635 640

Val Tyr Ser Gly Phe Gly Ser Gln His Arg Leu Met Ile Lys Glu Leu  
645 650 655

Cys Ser Ile Ser Pro Gln Phe Arg Glu Arg Ile Glu Glu Leu Asp Glu  
660 665 670

Met Val Lys Phe Glu Ser Gly Trp Ser Ile Met Lys Leu Val Leu Asp  
675 680 685

Asp Glu Gln Thr Tyr Asp Thr Glu Thr Ala Gln Val Val Ile Thr Ala  
690 695 700

Ile Gln Ile Ala Leu Thr Asp Leu Leu Ala Ser Phe Gly Val Lys Pro  
705 710 715 720

Ala Ala Val Met Gly Met Ser Met Gly Glu Ile Ala Ala Ala Tyr Ala  
725 730 735

Ile Glu Glu Asn Pro Glu Tyr Lys Gly Ile Glu Pro Ala Val Tyr Ala  
 785 790 795 800  
 Gly Pro Gly Met Thr Thr Val Gly Gly Pro Arg Asp Ala Val Val Gln  
 805 810 815  
 Phe Val Glu Lys Leu Glu Ser Glu Asp Lys Phe Ala Arg Leu Leu Asn  
 820 825 830  
 Val Lys Gly Ala Gly His Thr Ser Ala Val Glu Pro Leu Leu Gly Glu  
 835 840 845  
 Leu Ala Gly Glu Ile Ala Gly Ile Glu Pro Leu Pro Leu Gln Ile Pro  
 850 855 860  
 Leu Phe Ser Ser Val Asp Gln Gly Val Thr Tyr Pro Val Gly Ala Val  
 865 870 875 880  
 Val His Asp Ala Asp Tyr Met Leu Arg Cys Thr Arg Gln Ser Val Tyr  
 885 890 895  
 Phe Gln Asp Ser Thr Glu Ala Ala Phe Ala Ala Gly His Asn Thr Leu  
 900 905 910  
 Val Glu Ile Ser Pro Asn Pro Val Ala Leu Met Gly Met Met Asn Thr  
 915 920 925  
 Ala Phe Thr Val Gly Lys Pro Asp Ala Gln Leu Leu Phe Ser Leu Lys  
 930 935 940  
 Arg Lys Val Pro Glu Ala Glu Ser Leu Arg Asp Leu Leu Ala Lys Leu  
 945 950 955 960  
 Tyr Val Asn Gly Ala Asn Val Asp Phe Ser Ala Leu Tyr Gly Glu Gly  
 965 970 975  
 Glu Thr Ile Asp Pro Pro His Ile Thr Trp Lys His Gln Arg Phe Trp  
 980 985 990  
 Thr Ser Ala Arg Pro Ser Ser Gly Ala Ser Leu Asp Leu Pro Gly Phe  
 995 1000 1005  
 Arg Val Asn Leu Pro Asn Asn Thr Val Ala Phe Ser Thr Ala Ala Glu  
 1010 1015 1020  
 Leu Ala Pro Ser Ala Val Ala Ile Met Glu Ala Ala Ala Met Ala Val  
 1025 1030 1035 1040  
 Thr Pro Gly Ser Ser Val Asp Ala Val Asp Glu Arg Asp Met Leu Pro  
 1045 1050 1055  
 Pro Ser Gly Glu Ile Thr Thr Ile Val Thr Arg Ser Leu Gly Gly Leu  
 1060 1065 1070  
 Ser Leu Ser Val Tyr Lys Ile Glu Gly Thr Thr Ser Thr Leu Val Ala  
 1075 1080 1085

Glu Gly Phe Ala Ala Asn Pro Gly Phe Ala Ala Ala Ser Ser Phe Asp  
1090 1095 1100

Gly Pro Gly Tyr Asp Gly Phe Asn Thr Asp Tyr Ser Asp Gln Pro Asp  
1105 1110 1115 1120

Pro Arg Ser Asp Leu Pro Leu Asp Ile Glu Ala Val Arg Trp Asp Pro  
1125 1130 1135

Ala Thr Glu Thr Val Glu Glu Arg Met Arg Ala Ile Val Ser Glu Ala  
1140 1145 1150

Met Gly Tyr Asp Val Asp Asp Leu Pro Arg Glu Leu Pro Leu Ile Asp  
1155 1160 1165

Leu Gly Leu Asp Ser Leu Met Gly Met Arg Ile Lys Asn Arg Ile Glu  
1170 1175 1180

Asn Asp Phe Gln Ile Pro Pro Leu Gln Val Gln Ala Leu Arg Asp Ala  
1185 1190 1195 1200

Ser Val Ala Asp Val Val Ile Met Val Glu Asn Met Val Ala Gly Arg  
1205 1210 1215

Ser Ser Glu Thr Leu Val Asp Ala Thr Pro Gln Val Pro Ala Glu Ala  
1220 1225 1230

Ala Gly Glu Ala Gln Ala Ala Glu Ser Ser Ala Ser Gly Glu Asp Val  
1235 1240 1245

Gln Gly Val Gly Val Ala Pro Arg Asp Ala Ser Glu Arg Met Val Phe  
1250 1255 1260

Gly Thr Trp Ala Gly Leu Thr Gly Ala Ala Ala Gly Val Thr Ser  
1265 1270 1275 1280

Lys Leu Pro Gln Ile Asp Val Asp Thr Ala Thr Ala Ile Ala Glu Arg  
1285 1290 1295

Leu Thr Glu Arg Ser Gly Ile Glu Ile Ser Thr Glu Gln Val Leu Ala  
1300 1305 1310

Ala Glu Thr Leu Glu Pro Leu Ser Asp Leu Val Arg Glu Gly Leu Glu  
1315 1320 1325

Thr Glu Val Gln Gly Asn Ile Arg Val Leu Arg Gly Arg Ala Glu Gly  
1330 1335 1340

...

Tyr Val Asp Asp Ile Lys Lys Tyr Ser Asp Gly Phe Pro Val Val Leu  
 1395 1400 1405

Gly Gly Trp Ser Phe Gly Gly Ala Val Ala Phe Glu Val Ala His Gln  
 1410 1415 1420

Leu Val Gly Ser Asp Val Glu Val Ala Thr Val Ala Leu Leu Asp Thr  
 1425 1430 1435 1440

Val Gln Pro Ser Asn Pro Ala Pro Asp Thr Ala Glu Glu Thr Arg Ala  
 1445 1450 1455

Arg Trp Thr Arg Tyr Ala Asp Phe Ala Lys Lys Thr Tyr Gly Leu Asp  
 1460 1465 1470

Phe Glu Val Pro Phe Glu Ile Leu Asp Thr Ile Gly Glu Asp Gly Met  
 1475 1480 1485

Leu Ser Met Met Thr Asp Phe Leu Ala Asn Thr Asp Ala Ser Glu His  
 1490 1495 1500

Gly Leu Ser Ala Gly Val Leu Glu His Gln Arg Ala Ser Phe Val Asp  
 1505 1510 1515 1520

Asn Arg Ile Leu Ala Lys Leu Asn Phe Ala Asp Trp Ala Asn Val Glu  
 1525 1530 1535

Ala Pro Val Ile Leu Phe Arg Ala Glu Arg Met His Asp Gly Ala Ile  
 1540 1545 1550

Glu Leu Glu Pro Asn Tyr Ala Lys Ile Asp Gln Asp Gly Gly Trp Ser  
 1555 1560 1565

Gly Ile Val Asn Asp Leu Glu Ile Val Gln Leu Asn Gly Asp His Leu  
 1570 1575 1580

Ala Val Val Asp Glu Pro Glu Ile Gly Thr Val Gly Ala His Leu Ser  
 1585 1590 1595 1600

Arg Arg Ile Asp Glu Ile Ser Arg Lys Asn  
 1605 1610

<210> 3  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR pks13a

<400> 3  
gctggarctv acvtggarg c

<210> 4  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pks13b

<400> 4  
gtgsgcggtt gydcccraavc cgaa

24

<210> 5  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13Rtb

<400> 5  
gaggacatat ggctgacgta gcggaatc

28

<210> 6  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13Stb

<400> 6  
cggtgaaagc ttctgcttgc ctacctcact tg

32

<210> 7  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13Ttb

<400> 7  
gctcgggat cctcactgct tgcctacctc ac

32

<400> 8  
aatatgacta gtagccaaatc gtcggatcag aag 33

<210> 9  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13Dcg

<400> 9  
agctctagat ctctaattct tccgagaaat ctcat 35

<210> 10  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pkde15

<400> 10  
gaaatctcga gccacggcga aa 22

<210> 11  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pkde12

<400> 11  
acgattgccg cggttccata ttg 23

<210> 12  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pkde13

<400> 12  
catcctgttc cgcggAACgc atgc 24

<210> 13  
<211> 23  
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR pkde14

<400> 13

cagcatgatg gagatctgag ggc

23

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR fa2

<400> 14

tctgaccacc ttccgtgaag c

21

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR ac2

<400> 15

gaacgagttc agagcttc

18

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR K10

<400> 16

tatttcgaat ggttcgctgg gtttatc

27

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<210> 18  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pk1

<400> 18  
gccgtgacgg tatctcgg

18

<210> 19  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pk2

<400> 19  
ccagggcagt tgcttcaatg

20

<210> 20  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pk3

<400> 20  
tccggaaaga tctcacgccc cg

22

<210> 21  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR pk4

<400> 21  
gcgtgcgcgc agatctgcta gc

22

<210> 22  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> amorce PCR 13F

```
<400> 22
gctctagagt ttaaacgctg gacctgtcca acgtcaagg 39

<210> 23
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR 13G

<400> 23
ggactagtcg tcgaaaaccga ccgtcaccag 30

<210> 24
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR 13H

<400> 24
ggactagtcg gcatcttcaa cgagttgc 28

<210> 25
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR 13I

<400> 25
ccaagcttg tttaaacttg tcgaagtggc tcgacgg 37

<210> 26
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> amorce PCR 13J
```

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR 13K

<400> 27

cacgatcgag tcgagctcga

20

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR H1

<400> 28

agcaccagcg gttcgccgt

19

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR H2

<400> 29

tgcacgactt cgaggtgttc g

21

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR 13R

<400> 30

atgagatctg atgaaaacca cagcgat

27

<210> 31

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> amorce PCR 13P

<400> 31

ggactagtct tggcgacggc cttctcac

28

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**INV**

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../2...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		MJPbv644/112
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0310 U20
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
UTILISATION DE LA PROTEINE Pks 13 CODANT POUR LA CONDENSASE DES ACIDES MYCOLIQUES DES MYCOBACTERIES ET GENRES APPARENTES COMME CIBLE D'ANTIBIOTIQUES.		

LE(S) DEMANDEUR(S) :

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - 3, rue Michel Ange -75016 PARIS

UNIVERSITE PARIS SUD XI - 15 rue Georges Clémenceau - 91405 ORSAY Cedex

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1 Nom		GUILHOT
Prénoms		Christophe
Adresse	Rue	11 rue Jean François de la Pérouse
	Code postal et ville	13 160 00 MURET
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		DAFFE
Prénoms		Mamadou
Adresse	Rue	50 allée Henri Sallier
	Code postal et ville	13 140 00 TOULOUSE
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		HOUSSIN
Prénoms		Christine
Adresse	Rue	23 rue Michelet
	Code postal et ville	92370 CHAVILLE
Société d'appartenance (facultatif)		

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. indiquez en haut à droite le N° de la page suiv du nombre de pages.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94  
95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131  
132  
133  
134  
135  
136  
137  
138  
139  
140  
141  
142  
143  
144  
145  
146  
147  
148  
149  
150  
151  
152  
153  
154  
155  
156  
157  
158  
159  
160  
161  
162  
163  
164  
165  
166  
167  
168  
169  
170  
171  
172  
173  
174  
175  
176  
177  
178  
179  
180  
181  
182  
183  
184  
185  
186  
187  
188  
189  
190  
191  
192  
193  
194  
195  
196  
197  
198  
199  
200  
201  
202  
203  
204  
205  
206  
207  
208  
209  
210  
211  
212  
213  
214  
215  
216  
217  
218  
219  
220  
221  
222  
223  
224  
225  
226  
227  
228  
229  
230  
231  
232  
233  
234  
235  
236  
237  
238  
239  
240  
241  
242  
243  
244  
245  
246  
247  
248  
249  
250  
251  
252  
253  
254  
255  
256  
257  
258  
259  
260  
261  
262  
263  
264  
265  
266  
267  
268  
269  
270  
271  
272  
273  
274  
275  
276  
277  
278  
279  
280  
281  
282  
283  
284  
285  
286  
287  
288  
289  
290  
291  
292  
293  
294  
295  
296  
297  
298  
299  
300  
301  
302  
303  
304  
305  
306  
307  
308  
309  
310  
311  
312  
313  
314  
315  
316  
317  
318  
319  
320  
321  
322  
323  
324  
325  
326  
327  
328  
329  
330  
331  
332  
333  
334  
335  
336  
337  
338  
339  
340  
341  
342  
343  
344  
345  
346  
347  
348  
349  
350  
351  
352  
353  
354  
355  
356  
357  
358  
359  
360  
361  
362  
363  
364  
365  
366  
367  
368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401  
402  
403  
404  
405  
406  
407  
408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416  
417  
418  
419  
420  
421  
422  
423  
424  
425  
426  
427  
428  
429  
430  
431  
432  
433  
434  
435  
436  
437  
438  
439  
440  
441  
442  
443  
444  
445  
446  
447  
448  
449  
450  
451  
452  
453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477  
478  
479  
480  
481  
482  
483  
484  
485  
486  
487  
488  
489  
490  
491  
492  
493  
494  
495  
496  
497  
498  
499  
500  
501  
502  
503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527  
528  
529  
530  
531  
532  
533  
534  
535  
536  
537  
538  
539  
540  
541  
542  
543  
544  
545  
546  
547  
548  
549  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
550  
551  
552  
553  
554  
555  
556  
557  
558  
559  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
560  
561  
562  
563  
564  
565  
566  
567  
568  
569  
570  
571  
572  
573  
574  
575  
576  
577  
578  
579  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
580  
581  
582  
583  
584  
585  
586  
587  
588  
589  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
590  
591  
592  
593  
594  
595  
596  
597  
598  
599  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
600  
601  
602  
603  
604  
605  
606  
607  
608  
609  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
610  
611  
612  
613  
614  
615  
616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
640  
641  
642  
643  
644  
645  
646  
647  
648  
649  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
650  
651  
652  
653  
654  
655  
656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
670  
671  
672  
673  
674  
675  
676  
677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
700  
701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
730  
731  
732  
733  
734  
735  
736  
737  
738  
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
740  
741  
742  
743  
744  
745  
746  
747  
748  
749  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
750  
751  
752  
753  
754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766  
767  
768  
769  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
770  
771  
772  
773  
774  
775  
776  
777  
778  
779  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
820  
821  
822  
823  
824  
825  
826  
827  
828  
829  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
830  
831  
832  
833  
834  
835  
836  
837  
838  
839  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
840  
841  
842  
843  
844  
845  
846  
847  
848  
849  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
850  
851  
852  
853  
854  
855  
856  
857  
858  
859  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
860  
861  
862  
863  
864  
865  
866  
867  
868  
869  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
870  
871  
872  
873  
874  
875  
876  
877  
878  
879  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
880  
881  
882  
883  
884  
885  
886  
887  
888  
889  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
890  
891  
892  
893  
894  
895  
896  
897  
898  
899  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
900  
901  
902  
903  
904  
905  
906  
907  
908  
909  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
910  
911  
912  
913  
914  
915  
916  
917  
918  
919  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
920  
921  
922  
923  
924  
925  
926  
927  
928  
929  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
930  
931  
932  
933  
934  
935  
936  
937  
938  
939  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
940  
941  
942  
943  
944  
945  
946  
947  
948  
949  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
950  
951  
952  
953  
954  
955  
956  
957  
958  
959  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
960  
961  
962  
963  
964  
965  
966  
967  
968  
969  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
970  
971  
972  
973  
974  
975  
976  
977  
978  
979  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
980  
981  
982  
983  
984  
985  
986  
987  
988  
989  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
990  
991  
992  
993  
994  
995  
996  
997  
998  
999  
1000  
1001  
1002  
1003  
1004  
1005  
1006  
1007  
1008  
1009  
1000  
1001  
1002  
1003  
1004  
1005  
1006  
1007  
1008  
1009  
1010  
1011  
1012  
1013  
1014  
1015  
1016  
1017  
1018  
1019  
1010  
1011  
1012  
1013  
1014  
1015  
1016  
1017  
1018  
1019  
1020  
1021  
1022  
1023  
1024  
1025  
1026  
1027  
1028  
1029  
1020  
1021  
1022  
1023  
1024  
1025  
1026  
1027  
1028  
1029  
1030  
1031  
1032  
1033  
1034  
1035  
1036  
1037  
1038  
1039  
1030  
1031  
1032  
1033  
1034  
1035  
1036  
1037  
1038  
1039  
1040  
1041  
1042  
1043  
1044  
1045  
1046  
1047  
1048  
1049  
1040  
1041  
1042  
1043  
1044  
1045  
1046  
1047  
1048  
1049  
1050  
1051  
1052  
1053  
1054  
1055  
1056  
1057  
1058  
1059  
1050  
1051  
1052  
1053  
1054  
1055  
1056  
1057  
1058  
1059  
1060  
1061  
1062  
1063  
1064  
1065  
1066  
1067  
1068  
1069  
1060  
1061  
1062  
1063  
1064  
1065  
1066  
1067  
1068  
1069  
1070  
1071  
1072  
1073  
1074  
1075  
1076  
1077  
1078  
1079  
1070  
1071  
1072  
1073  
1074  
1075  
1076  
1077  
1078  
1079  
1080  
1081  
1082  
1083  
1084  
1085  
1086  
1087  
1088  
1089  
1080  
1081  
1082  
1083  
1084  
1085  
1086  
1087  
1088  
1089  
1090  
1091  
1092  
1093  
1094  
1095  
1096  
1097  
1098  
1099  
1090  
1091  
1092  
1093  
1094  
1095  
1096  
1097  
1098  
1099  
1100  
1101  
1102  
1103  
1104  
1105  
1106  
1107  
1108  
1109  
1100  
1101  
1102  
1103  
1104  
1105  
1106  
1107  
1108  
1109  
1110  
1111  
1112  
1113  
1114  
1115  
1116  
1117  
1118  
1119  
1110  
1111  
1112  
1113  
1114  
1115  
1116  
1117  
1118  
1119  
1120  
1121  
1122  
1123  
1124  
1125  
1126  
1127  
1128  
1129  
1120  
1121  
1122  
1123  
1124  
1125  
1126  
1127  
1128  
1129  
1130  
1131  
1132  
1133  
1134  
1135  
1136  
1137  
1138  
1139  
1130  
1131  
1132  
1133  
1134  
1135  
1136  
1137  
1138  
1139  
1140  
1141  
1142  
1143  
1144  
1145  
1146  
1147  
1148  
1149  
1140  
1141  
1142  
1143  
1144  
1145  
1146  
1147  
1148  
1149  
1150  
1151  
1152  
1153  
1154  
1155  
1156  
1157  
1158  
1159  
1150  
1151  
1152  
1153  
1154  
1155  
1156  
1157  
1158  
1159  
1160  
1161  
1162  
1163  
1164  
1165  
1166  
1167  
1168  
1169  
1160  
1161  
1162  
1163  
1164  
1165  
1166  
1167  
1168  
1169  
1170  
1171  
1172  
1173  
1174  
1175  
1176  
1177  
1178  
1179  
1170  
1171  
1172  
1173  
1174  
1175  
1176  
1177  
1178  
1179  
1180  
1181  
1182  
1183  
1184  
1185  
1186  
1187  
1188  
1189  
1180  
1181  
1182  
1183  
1184  
1185  
1186  
1187  
1188  
1189  
1190  
1191  
1192  
1193  
1194  
1195  
1196  
1197  
1198  
1199  
1190  
1191  
1192  
1193  
1194  
1195  
1196  
1197  
1198  
1199  
1200  
1201  
1202  
1203  
1204  
1205  
1206  
1207  
1208  
1209  
1200  
1201  
1202  
1203  
1204  
1205  
1206  
1207  
1208  
1209  
1210  
1211  
1212  
1213  
1214  
1215  
1216  
1217  
1218  
1219  
1210  
1211  
1212  
1213  
1214  
1215  
1216  
1217  
1218  
1219  
1220  
1221  
1222  
1223  
1224  
1225  
1226  
1227  
1228  
1229  
12

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**BREVET D'INVENTION**

**CERTIFICAT D'UTILITÉ**

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 2.../2...**

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

**INV**

Vos références pour ce dossier (facultatif)	MJPbv644/112																
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0310470																
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces maximum)																	
UTILISATION DE LA PROTEINE Pks 13 CODANT POUR LA CONDENSASE DES ACIDES MYCOLIQUES DES MYCOBACTERIES ET GENRES APPARENTES COMME CIBLE D'ANTIBIOTIQUES.																	
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>																	
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - 3, rue Michel Ange -75016 PARIS																	
UNIVERSITE PARIS SUD XI - 15 rue Georges Clémenceau - 91405 ORSAY Cedex																	
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>																	
<table border="1"> <tr> <td><b>1</b> Nom</td> <td>PORTEVIN</td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td>Damien</td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue</td> <td>135 Avenue de Lespinet</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>Résidence King, Apt 47</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Code postal et ville</td> <td>31140 Toulouse</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> <td></td> </tr> </table>		<b>1</b> Nom	PORTEVIN	Prénoms	Damien	Adresse	Rue	135 Avenue de Lespinet			Résidence King, Apt 47		Code postal et ville	31140 Toulouse	Société d'appartenance (facultatif)		
<b>1</b> Nom	PORTEVIN																
Prénoms	Damien																
Adresse	Rue	135 Avenue de Lespinet															
		Résidence King, Apt 47															
	Code postal et ville	31140 Toulouse															
Société d'appartenance (facultatif)																	
<table border="1"> <tr> <td><b>2</b> Nom</td> <td>DE SOUSA</td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td>Célia</td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue</td> <td>49 rue de Montjay</td> </tr> <tr> <td></td> <td>Code postal et ville</td> <td>91140 ORSAY</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> <td></td> </tr> </table>		<b>2</b> Nom	DE SOUSA	Prénoms	Célia	Adresse	Rue	49 rue de Montjay		Code postal et ville	91140 ORSAY	Société d'appartenance (facultatif)					
<b>2</b> Nom	DE SOUSA																
Prénoms	Célia																
Adresse	Rue	49 rue de Montjay															
	Code postal et ville	91140 ORSAY															
Société d'appartenance (facultatif)																	
<table border="1"> <tr> <td><b>3</b> Nom</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Prénoms</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Adresse</td> <td>Rue</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>Code postal et ville</td> <td>11111</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Société d'appartenance (facultatif)</td> <td></td> </tr> </table>		<b>3</b> Nom		Prénoms		Adresse	Rue			Code postal et ville	11111	Société d'appartenance (facultatif)					
<b>3</b> Nom																	
Prénoms																	
Adresse	Rue																
	Code postal et ville	11111															
Société d'appartenance (facultatif)																	
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivie du nombre de pages.																	
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> <b>(Nom et qualité du signataire)</b>																	
Paris, le 4 septembre 2003																	
VIALLE-PRESLES Marie José																	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**